

**Untersuchungen zur photometrischen Bestimmung
von Hydroxyprolin**

Rainer Watermann

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552618_0068

DISSERTATIONS— UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus der Hautklinik der
Johannes Gutenberg - Universität
Mainz

(Leitung: Prof. Dr. med. G. W. Korting)

Untersuchungen zur photometrischen
Bestimmung von Hydroxyprolin

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg - Universität in Mainz

den Medizinischen Fachbereichen

vorgelegt von

RAINER WATERMANN

aus Meißen/Nordrheinwestfalen

Mainz 1978

Fachbereichsdekan: Herr Professor Dr. E. Straub
1. Gutachter : Herr Professor Dr. B. Morsches
2. Gutachter : Herr Professor Dr. H. Langendorf



I N H A L T S Ü B E R S I C H T

	Seite
1. Einleitung.....	1
1.1. Kollagenstoffwechsel.....	2
1.1.1. Biosynthese.....	2
1.1.2. Umsatz, Abbau und Ausscheidung.....	5
1.2. Methoden zur Bestimmung von Hydroxyprolin.....	12
2. Problemstellung.....	18
3. Experimenteller Teil.....	21
3.1. Untersuchung zur photometrischen Messung von Hydroxyprolin.....	21
3.1.1. Bestimmung von Hydroxyprolin nach STEGEMANN....	21
3.1.2. Absorptionsspektrum.....	23
3.1.3. Dekarboxylierungszeit	25
3.1.4. Zerstörung überschüssigen Oxidationsmittels....	26
3.1.5. Farbkomplexbildung.....	27
3.1.6. Lösungsmittel.....	29
3.1.7. Oxidation.....	30
3.2. Modifizierung der Hydroxyprolinbestimmung anhand der Untersuchungsergebnisse.....	35
3.2.1. Arbeitsvorschrift.....	35
3.2.2. Reproduzierbarkeit.....	37
3.3. Das modifizierte Verfahren im Vergleich mit anderen Hydroxyprolinbestimmungsmethoden.....	37

II.

4.	Ergebnisse und Diskussion.....	41
4.1.	Oxidation von Hydroxyprolin.....	42
4.2.	Farbkomplexbildung.....	44
4.3.	Reaktionsmilieu.....	46
4.4.	Absorptionsspektrum.....	48
4.5.	Modifizierung des STEGEMANN'schen Verfahrens...	49
4.6.	Vergleich verschiedener Methoden.....	50
5.	Zusammenfassung.....	54
6.	Anhang.....	55 a
7.	Literaturverzeichnis.....	67

1. Einleitung

Im Organismus der Säugetiere und des Menschen ist das Skleroprotein Kollagen ein wesentlicher Bestandteil des Mesenchyms und seiner speziellen Differenzierungsformen, wie Haut, Sehnen, Knochen, Zähne u.a..

Charakteristisch für das Kollagen ist seine Aminosäurezusammensetzung, die sich wesentlich von der anderer Proteine unterscheidet (GRASSMANN et al., 1965; REICH, 1966; HANNIG u. NORDWIG, 1967; KORTING u. HOLZMANN, 1967).

Im Gegensatz zu anderen Eiweißkörpern, wie z.B. Fibrinogen, Keratin oder Casein, liegt beim Kollagen ein bemerkenswert konstanter und hoher Anteil an Glycin, Prolin und Hydroxyprolin vor, wobei insbesondere der Gehalt an Hydroxyprolin als auch Hydroxylysin als äußerst spezifisch für Kollagen angesehen werden kann (GRASSMANN et al., 1965; REICH, 1966).

Aminosäure	Kollagen TRISTAM (1157)	Elastin TRISTAM (1157)	Keratin TRISTAM (1157)	Fibroin LUCAS et al. (687)	Fibrinogen TRISTAM (1157)	Casein HIPPEL et al. (470)
Glycin	363,0	376,0	87,0	571,0	74,7	26,8
Prolin	131,3	135,8	82,6	3,9	49,5	71,6
Hydroxyprolin	107,0	9,4	--	--	--	--
Hydroxylysin	6,8	--	--	--	--	--
Tyrosin	5,5	7,7	25,7	66,6	30,4	40,3
Tryptophan	--	--	8,8	2,0	16,0	9,8
Cystin/2	--	5,0	98,9	--	19,0	3,7
Saure AS	124,3	27,0	150,1	30,1	197,2	205,1
Basische AS	91,7	10,0	85,4	12,0	124,9	203,3

Tab.1 : Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von Kollagen mit der einiger anderer Proteine (Mol AS pro 1000 Mol AS) (nach REICH, 1966)

Das einzigartige Vorkommen des Hydroxyprolins innerhalb des Kollagens findet seine Ursache in einem besonderen Synthesemechanismus dieses Skleroproteins, auf den anschließend näher eingegangen werden soll.

1.1. Kollagenstoffwechsel

1.1.1. Biosynthese

Im allgemeinen unterscheidet sich die Biosynthese des Kollagens zunächst nicht von den grundlegenden Prinzipien der Proteinsynthese (REICH, 1966; CHVAPIL u. HURYCH, 1968). Im Verlauf der Synthese ergeben sich jedoch Besonderheiten in Form zusätzlicher Reaktionen. So finden an den ursprünglich an den Polysomen gebildeten Polypeptidketten weitere intra- und extrazelluläre Veränderungen statt, zu denen auch die Bildung von Hydroxyprolin gehört. Diese Aminosäure wird nicht direkt in die Polypeptidketten eingebaut, sondern es kommt zunächst zur Synthese eines hydroxyprolinfreien, prolinreichen Protokollagens, dessen Prolinreste durch eine Protokollagenhydroxylase in Hydroxyprolin umgewandelt werden (LUKENS, 1965; PROCKOP u. JUVA, 1965; JUVA et al., 1966; KIVIRIKKO u. PROCKOP, 1967 a,b,c).

Auf diese Weise entstehen als primäres Produkt der Kollagensynthese sogenannte α -Ketten, die eine Helixkonfiguration aufweisen. Drei α -Ketten (PIEZ, 1964; GRASSMANN et al., 1965; KUHN, 1969) verdrillen sich sodann zu einer rechtsdrehenden Superhelix.

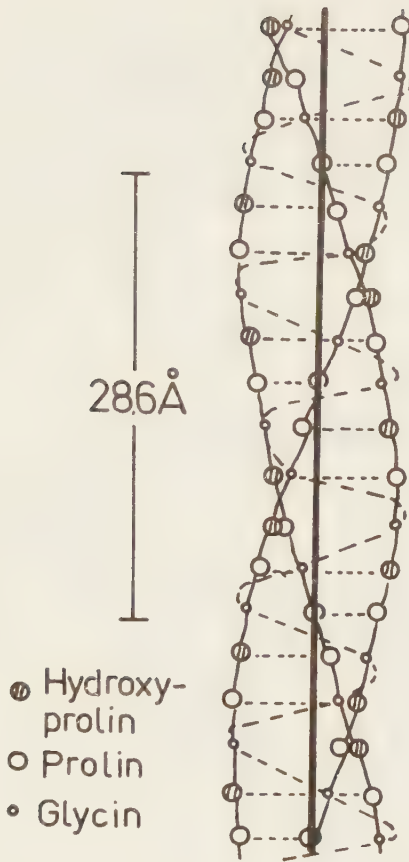


Abb.1

Schematische Darstellung der Struktur des Kollagenmoleküls. 3 helikale Peptidketten bilden eine Superhelix mit einer Ganghöhe von 28,6 Å (n. BUDDECKE, 1971)

Der Proteinsynthese folgt schließlich die Anheftung einer prosthetischen Kohlenhydratgruppe, so daß als Endprodukt der intrazellulären Kollagenbiosynthese das so-

nannte Tropokollagen entsteht. Diese neutralsalzlöslichen stäbchenförmigen Kollagenmoleküle werden aus den Fibroblasten in den Extrazellulärraum sezerniert, wo es durch Ausbildung intra- und interzellulärer Quervernetzungen unter Abnahme der Löslichkeit zu einer steigenden Festigkeit der Kollagenfibrillen kommt (BUDDECKE, 1971)

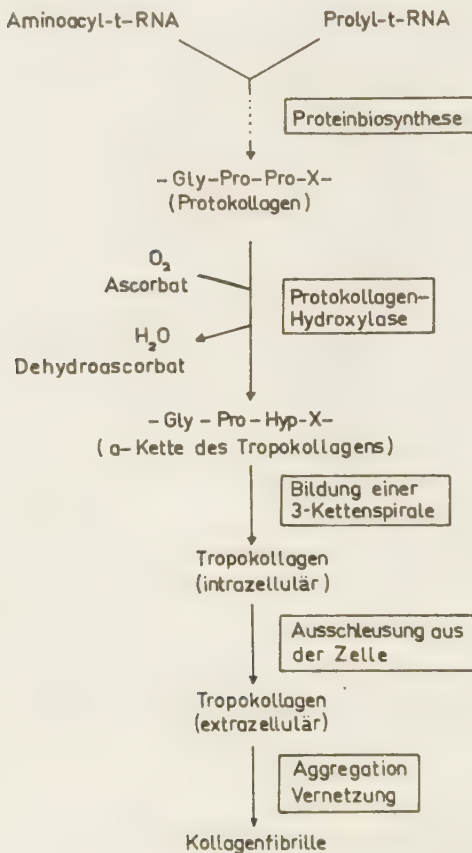


Abb. 2

Schema der Kollagenbiosynthese (n.BUDDECKE, 1971)

Entsprechend dieser Ausdifferenzierung und der unterschiedlichen Löslichkeit des Kollagens in verschiedenen Extraktionsmitteln - 0,14 M NaCl, 0,45 M NaCl und verdünnten Säuren - können schließlich drei verschiedene Kollagenfraktionen unterschieden werden: das neutral-salzlösliche, das säurelösliche und das unlösliche Kollagen (GREEN u. LOWTHER, 1959; GROSS, 1959; JACKSON u. BENDLEY, 1960).

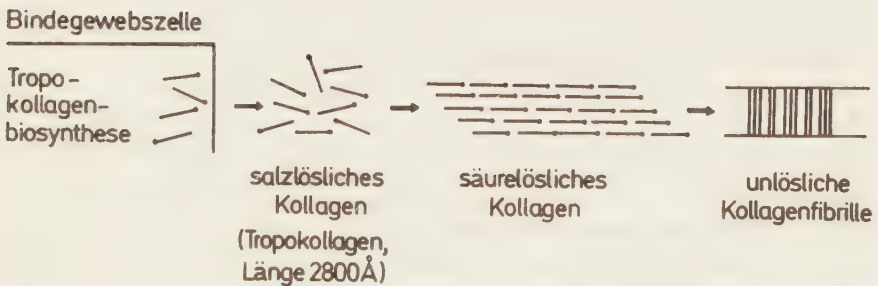


Abb. 3

Extrazelluläre Reifung des Kollagens (n.BUDDECKE, 1971).

1.1.2. Umsatz, Abbau und Ausscheidung

Kollagen unterliegt einem ständigen Umsatz. Spezifische Kollagenasen sind dazu befähigt, natives Kollagen abzu-

bauen. Diese Kollagenasen spalten das Tropokollagen zunächst in zwei Bruchstücke (NAGAI et al., 1966), die dann einem weiteren Abbau durch die erwähnten Kollagenasen, durch unspezifische Proteasen oder durch spezifische Kollagenpeptidasen unterworfen werden. (WOESSNER, 1968)

Die Abbauprodukte finden sich als freies, peptid- und proteingebundenes Hydroxyprolin im Bindegewebe (CHVAPIL u. CMUCHALOVA, 1961; KOBRLE u. CHVAPIL, 1961a; KIVIRIKKO, 1963; CHVAPIL u. JACKSON, 1964; SCHULZ-HAUDT et al., 1965) und im Plasma KOBRLE u. CHVAPIL, 1961; LeROY et al., 1964; FREY, 1965; KIBRICK et al., 1965). Sie werden entweder direkt über die Niere ausgeschieden oder einem weiteren Katabolismus unterworfen (ADAMS, 1970), da sie für eine Neusynthese von Hydroxyprolin nicht wieder verwendet werden können (CHVAPIL u. JACKSON, 1964; HURYCH u. CHVAPIL, 1965). Das freie Hydroxyprolin wird fast vollständig in den Tubuli zurückresorbiert und weist daher nur eine geringe Clearancerate auf (PROCKOP et al., 1962; BENOIT et al., 1964; SCRIVER u. GOLDMAN, 1966; BENOIT u. WATTEN, 1968). Sein weiterer Abbau erfolgt dann hauptsächlich in der Leber und der Niere (ADAMS u. GOLDSTONE, 1960 a,b; GOLDSTONE u. ADAMS, 1962; ADAMS, 1970). Die Hydroxyprolin-enhaltenden Peptide werden demgegenüber sehr schnell über die Niere ausgeschieden (PROCKOP et al., 1962; BENOIT et al., 1964; BENOIT u. WATTEN, 1968). Im Urin liegen daher 95 % des ausgeschiedenen Hydroxyprolins in peptidgebundener Form und weniger als 5 % als freie Aminosäure vor (ZIFF et al., 1956; PROCKOP u. SJOERDSMA, 1961; KIBRICK et al., 1962; MEILMAN et al., 1963).

Zahlreiche Isotopenstudien bei Ratten (PROCKOP, 1964; KIVIRIKKO et al., 1965; LAITINEN, 1967) führten zu wich-

tigen Ergebnissen über die Beziehungen zwischen der Hydroxyprolinausscheidung im Urin und dem Kollagenabbau im Gewebe:

Insgesamt werden nur etwa 10 % des dem Kollagenabbau entstammenden Hydroxyprolins im Urin ausgeschieden, so daß erst massive Veränderungen im Kollagenstoffwechsel auftreten müssen, um meßbare Veränderungen in der Hydroxyprolinausscheidung hervorzurufen. Das ausgeschiedene Hydroxyprolin entstammt allen drei Kollagenfraktionen, der in 0,14 M NaCl, in 0,45 M NaCl, in Säure löslichen und der unlöslichen Fraktion.

Dabei ist die Umsatzrate des reifen Kollagens in einzelnen Organen annähernd gleich, so daß unter physiologischen Bedingungen das im Urin ausgeschiedene Hydroxyprolin auf den Kollagenabbau in den verschiedensten Organen zurückzuführen ist. Das proteingebundene Hydroxyprolin im Serum verhält sich ähnlich wie das im Urin ausgeschiedene Hydroxyprolin und spiegelt weitgehend den Umsatz der neutralsalzlöslichen Kollagenfraktion des Gewebes wieder (MORSCHES, 1973).

Abb. 4 zeigt, daß die Hydroxyprolinausscheidung von mehreren Faktoren beeinflußt wird (BOLLET, 1967; PROCKOP u. KIVIRIKKO, 1967, 1968). Tierexperimentelle Untersuchungen mit definierten Veränderungen im Kollagenstoffwechsel (KIVIRIKKO, 1970) haben ergeben, daß sich die Hydroxyprolinausscheidung im Urin immer dann ändert, wenn sich 1. die lösliche Kollagenfraktion oder 2. die Umwandlungsrate der unlöslichen in die lösliche Fraktion ändert und wenn 3. eine Beschleunigung oder Verlangsamung im Abbau der drei Fraktionen stattfindet. Eine physiologisch erhöhte Hydroxyprolinausscheidung kann sich demnach aufgrund einer gesteigerten Kollagensynthese ergeben (s_1 u. s_2), wie sie in der Wachstumsphase vorkommt (JASIN et al., 1962), aber auch durch

alimentäre Zufuhr von Hydroxyprolin, z.B. in Form von Gelatine, einem thermisch gespaltenen Kollagen, Fisch und Fleischgerichten, so daß die Hydroxyprolinbestimmung eine entsprechende Diät voraussetzt (SJOERDSMA et al, 1965).

Verminderte Hydroxyprolinausscheidungen treten dagegen physiologischerweise bei einer Einschränkung der Kollagensynthese (s_1 u. s_2) und des Abbaus der einzelnen Fraktionen auf (d_1, d_2, d_3), wie sie etwa bei der Alterung eines Individuums vorkommen (JASIN et al., 1962). Die eigentliche Bedeutung der Hydroxyprolinbestimmung liegt jedoch darin, daß bestimmte Krankheiten, bei denen man eine primäre oder sekundäre systemische Beeinflussung des Kollagenstoffwechsels findet, zu meßbaren Veränderungen der Hydroxyprolinausscheidung im Urin führen können, die sich meistens durch einen vermehrten Abbau der drei Kollagenfraktionen ergeben (d_1, d_2, d_3).

Damit öffnet sich ein Weg zur Diagnostik und Therapiekontrolle aller Krankheiten, die mit einem pathologischen Kollagen-Um- oder Abbau einhergehen. Dazu gehören vor allem Erkrankungen des Endokriniums mit Beeinflussung des Kollagenstoffwechsels, Krankheiten mit relativ starker Knochenbeteiligung und Hauterkrankungen (Le ROY, 1967; KIVIRRIKO, 1970; LAITINEN, 1975).

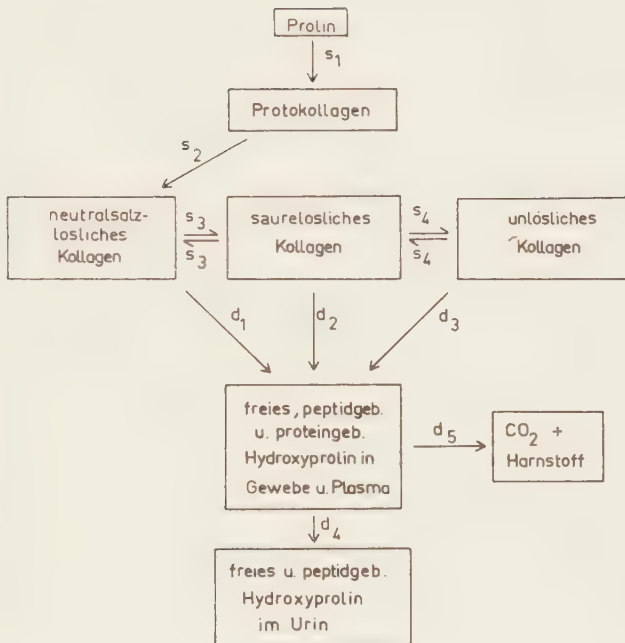


Abb. 4

Schematische Darstellung der Beziehung zwischen Kollagenstoffwechsel und Hydroxyprolin-Ausscheidung (n.KIVIRIKKO, 1970)

1. Ursachen für erhöhte Hydroxyprolinausscheidung:

Physiologische Ursachen:

Erhöhte Kollagenzufuhr durch Nahrung
Wachstum
Schwangerschaft

Pathologische Ursachen:

Knochentuberkulose
Primäre Knochentumore
Sekundäre Knochentumore
Paget' Krankheit
Osteogenesis imperfecta Krankheiten der Knochen
Osteomalazie und des Bindegewebes
Osteoporose⁺
Rheumatische Arthritis
Marfan' Symptomenkomplex
Knochenbrüche

Hyperthyreoidismus
Hyperparathyreoidismus Erkrankungen der endo-
Gigantismus krinen Drüsen
Akromegalie
Cushing' Syndrom⁺

Psoriasis (erythrodermica, guttata)
Sklerodermie Krankheiten der Haut
Dermatomyositis⁺

Systematischer Lupus erythematoses⁺
Polyarteriitis nodosa⁺
Leberzirrhose (aktive Phase) andere Krankheiten und
Stoffwechselstörungen Ursachen
Verbrennungen
Knotenlepra
Familiäre Hydroxyprolinämie

2. Ursachen für verminderte Hydroxyprolinausscheidung:

Primäre Wachstumsstörung verursacht z.B. durch Unter-
funktion der Hypophyse
Sekundäre Wachstumsstörung bei Kwashiorkor, Unterernäh-
rung, chronischen Nieren-
krankheiten, Stoffwechsel-
störungen, durch Herzver-
sagen verursachter Hypoxie
Hypothyreoidismus⁺
Hypoparathyreoidismus
Durch Vitamin-D-Mangel verursachte Rachitis

Tab 2.

Veränderungen in der Hydroxyprolinausscheidung

+ Veränderungen in der Hydroxyprolinausscheidung kommen nicht
regelmäßig vor.

Genaue Angaben über die Hydroxyprolinausscheidung im 24-Stunden-Urin bei Kranken sind aber nur dann möglich, wenn Alter, diätische Einflüsse und renale Clearance berücksichtigt werden. Dieses erfordert die Bestimmung des Kreatinins im Harn und die Vermeidung hydroxyprolinreicher Kost, wie Fisch, Fleisch und Gelatine (LANGNESS, 1970).

Eine gleichrangige Aussagekraft in der Diagnostik und insbesondere in der Aktivitätsbestimmung von Erkrankungen des Kollagenstoffwechsels kommt dem proteingebundenen Hydroxyprolin im Serum zu, das im Gegensatz zum diätisch sehr beeinflussbaren freien und peptidgebundenen Hydroxyprolin als ein signifikanter Parameter des Kollagenmetabolismus angesehen werden kann (KEISER et al., 1963). In Untersuchungen von Le ROY und SJOERDSMA (1965) wurde festgestellt, daß das proteingebundene Hydroxyprolin im Plasma von Alter und Ernährung weitgehend unabhängig ist und vornehmlich bei progredient verlaufenden Krankheiten wie z.B. Neoplasien, Erkrankungen des Knochens bzw. des Bindegewebes, Nierenerkrankungen und der Lymphogranulomatose mit einem signifikanten Anstieg einhergeht. Ein anderer Autor zeigt Korrelationen zwischen dem Serumspiegel und der Aktivität der Primär Chronischen Polyarthritits auf (KRIEGL et al., 1970). Bei der Psoriasis läßt sich mit Hilfe der Bestimmung des proteingebundenen Hydroxyprolins im Serum eine Mitbeteiligung des Bindegewebes in Abhängigkeit von der Akuität des Krankheitsgeschehens feststellen (HOLZMANN et al., 1970).

1.2. Methoden zur Bestimmung von Hydroxyprolin

Grundsätzlich kann das Hydroxyprolin im Gewebe, im Urin und im Serum bestimmt werden. Am besten hat sich jedoch in der Diagnostik und Verlaufskontrolle von Erkrankungen mit verändertem Kollagenstoffwechsel die quantitative Bestimmung des im Urin ausgeschiedenen Hydroxyprolins bewährt, wohingegen sich die Bestimmung von proteingebundenem Hydroxyprolin im Serum aufgrund der aufwendigen Methodik noch nicht durchsetzen konnte.

Die verschiedenen Verfahren zur Bestimmung von Hydroxyprolin beruhen entweder auf einer Pyrrol-Reaktion mit Isatin (LANG, 1933), mit Ninhydrin (TROLL u. CANNAN, 1953) oder auf einer Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (p-DAB) nach Umwandlung des Hydroxyprolins zu Pyrrol (NEUMANN u. LOGAN, 1950).

LANG entwickelte 1933 die erste Methode zur quantitativen Messung von Hydroxyprolin. Er oxidierte Hydroxyprolin im alkalischen Milieu mit Natriumhypochlorid, trieb das gebildete Pyrrol ab und ließ es bei saurem pH mit Isatin zu einem blauen Farbkomplex reagieren, um anschließend eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchführen zu können (LANG, 1933). MCFARLANE und GUEST (1939) benutzten zur Oxidation Natriumperoxid in Gegenwart von Cu-II-Ionen. NEUMANN und LOGAN (1950) beschrieben ein Verfahren, bei dem nach Oxidation von Hydroxyprolin mit Natriumperoxid und anschließender Neutralisation mit Schwefelsäure ein roter Pyrrol-p-DAB-Farbkomplex gebildet wurde. Diese Methode erwies sich als weitaus empfindlicher als die Farbkomplexbildung mit Isatin und wurde zur Grundlage für eine Reihe von weiteren Veränderungen durch andere Autoren (Le ROY 1967).

Die außerordentlich hohe Anzahl der nachfolgenden modifizierten Methoden macht deutlich, daß sich bestimmte Schwierigkeiten bei der Hydroxyprolinbestimmung ergeben haben. Besonders auffällig ist dabei das Fehlen der Reproduzierbarkeit bei simultan gemessenen Standardproben, das Vorkommen unterschiedlicher Eichkurven und Störungen durch andere Komponenten, die besonders dann auftreten, wenn die Hydroxyprolinkonzentration sehr niedrig ist (JACKSON u. CLEARY, 1967). Solche Störungen ergeben sich unter anderem aufgrund einer ungenügenden Reduktion des verbliebenen Oxidationsmittels, durch instabile Farbkomplexe, wie sie in Gegenwart von Mineralsäuren vorkommen (JACKSON u. CLEARY, 1967) und wenig stabile Oxidationsmittel, wie Hydrogenperoxid und Natriumhyprobromit (KIVIRIKKO, 1970).

STEGEMANN (1958) änderte das Oxidationsmittel und führte in seiner Bestimmungsmethode die Oxidation nicht im alkalischen Milieu durch, sondern in einem schwach sauren Puffer von pH 6 mittels p-Toluolsulfonchloramid-Natrium (Chloramin-T). Anschließend wird nach Bildung des Pyrrols mit Perchlorsäure angesäuert und damit sowohl überschüssiges Chloramin T zerstört als auch die Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd vorbereitet. Die Verwendung von Perchlorsäure hat den Vorteil, daß das Verfahren auch in Gegenwart von Mg-, Ca- oder Ba-Ionen angewandt werden kann. Störungen durch praktisch vorkommende Konzentrationen an Begleitaminosäuren sind bei der Bestimmungsmethode nach STEGEMANN auch bei hydroxyprolinarmen und tyrosin- oder tryptophanreichen Proben nicht beobachtet worden (STEGEMANN, 1958). Das Verfahren erwies sich als so empfindlich und spezifisch, daß Chloramin-T in den meisten folgenden Modifikationen der Hydroxyprolinbestimmung Verwendung fand. Allerdings versuchte man, das Bestimmungsverfahren durch Abtrennung störender Begleitsub-

stanzen noch zu verbessern (s. Tab. 3).

PROCKOP und UDENFRIEND führten 1960 eine Technik ein, bei der sie zunächst nichtspezifische Chromogene und andere Produkte, die die Farbkomplexbildung beeinflussen können, aus dem zu untersuchenden biologischen Material mit Hilfe von Aktivkohle abtrennen. Das Hydroxyprolin wird anschließend im alkalischen Milieu in Gegenwart eines Überschusses an Alanin mit Chloramin-T oxidiert. Dadurch wird erreicht, daß die Pyrrolbildung nicht durch Aminosäuren wie Tyrosin, Tryptophan oder ähnliche Substanzen, wie sie in Urin- oder Gewebehydrolysaten vorkommen, beeinflußt wird. Zusätzlich werden störende Begleitsubstanzen gleich zu Beginn des Oxidationsvorgangs mit Toluol abgetrennt. Pyrrol wird dann nach Abschluß der Oxidation mittels Toluol extrahiert und der Reaktion mit p-DAB zugeführt (PROCKOP und UDENFRIEND, 1960). Das Verfahren kann für die meisten zu untersuchenden biologischen Proben ohne chromatographische Abtrennung störender Substanzen verwandt werden, bei der Hydroxyprolinbestimmung im Plasma ist jedoch eine vorherige Extraktion von Hydroxyprolin durch chromatographische Methoden notwendig, um die notwendige Spezifität zu wahren (Le ROY et al., 1964).

Für die Routinebestimmung einer großen Anzahl von Proben erwies sich das Verfahren als nicht geeignet, so daß einige Änderungen eingeführt wurden, um die Methode zu vereinfachen ohne die Spezifität der Originalmethode zu beeinträchtigen (LAITINEN et al., 1966; HOWELLS and WHITEHEAD, 1967; KIVIRIKKO et al., 1967).

Die Entwicklung von Hydroxyprolinbestimmungsmethoden, bei denen störende Begleitsubstanzen vor der eigentlichen photometrischen Bestimmung durch chromatographische Verfahren abgetrennt werden, ergab die Möglichkeit, die Spezifität der Bestimmung auch dann zu gewährleisten, wenn störende Begleitsubstanzen in großen Mengen vorliegen, wie dies zum Beispiel im Plasma der Fall ist. Am häu-

figsten kommt heute neben der Dünnschicht- und Gaschromatographie die Säulenchromatographie zur Anwendung (s. Tab. 3)

Andere Methoden zur Hydroxyprolinbestimmung wie etwa die Isotopenverdünnung (KEISER et al., 1963; STANLEY et al., 1966) oder enzymatische Verfahren (ROSANO, 1966; LAMPORT, 1969) haben sich für die Routinediagnostik nicht durchsetzen können. Lediglich einige automatisierte Bestimmungsverfahren (GRANT, 1964; DREUX and LEYMARIE, 1968; JONES et al., 1970; PENNOCK et al., 1970; BANNISTER and BURNS, 1970; SEYMOUR and JACKSON, 1974; ORLOFF et al., 1975) haben in letzter Zeit neben den üblichen manuellen Verfahren im klinisch-chemischen Labor an Bedeutung gewonnen.

Tabelle 3:

Photometrische Verfahren zur Hydroxyprolinbestimmung mittels Farbkomplexbildung mit p-DAB nach Oxidation des Hydroxyprolins mit Chloramin-T oder Hydrogenperoxid

I. Ohne Abtrennung störender Faktoren:

NEUMAN and LOGAN, 1950; MARTIN and AXELROD, 1953; BAKO et al., 1953; WIERBICKI and DEATHERAGE, 1954; MIYADA and TAPPEL, 1956; GRUNBAUM and GLICK, 1956; LOLLAR, 1958; FELLs, 1958; STEGEMANN, 1958; BOWES, 1959; LEACH, 1960; ONITSUKA, 1960; HUTTERER and SINGER, 1960; BEKHOR and BAVETTA, 1961; WOESSNER, 1961; HURYCH and CHVAPIL, 1962; DAHL and PERRSON, 1963; BERGMAN and LOXLAY, 1963; ZAIDES et al., 1964; BLOOMFIELD and FARRAR, 1964; KO, 1964; KOEVOET, 1965; FIRSCHEIN and SHILL, 1966; BERGMANN and LOXLAY, 1969; CHENG, 1969; BERGMANN and LOXLAY, 1970; ZENDER, 1972; LEVINE, 1973; BONDJERS and BJÖRKERND, 1973;

II. Destillation von Hydroxyprolin-Oxidationsprodukten:

LANG, 1933; WALDSCHMIDT-LEITZ and AKABORI, 1934; WISS, 1949; MITOMA et al., 1959; SERAFINI-CESSI and CESSI, 1964; MÜHLBACH et al., 1966; DUPONT, 1967;

III. Extraktion von Hydroxyprolin-Oxidationsprodukten:

MITOMA et al., 1959; PROCKOP and UDENFRIEND, 1960; JOLL et al., 1963; PIL'v and TITAEV, 1963; LAITINEN et al., 1966; FILLIAT et al., 1966; KIVIRIKKO et al., 1967; HOWELLS and WHITEHEAD, 1967; SWITZER and SUMMER, 1971; BLUMENKRANTZ and ASBOE-HANSEN, 1973;

IV. Extraktion nichtspezifischer Chromogene:

PROCKOP and UDENFRIEND, 1960; HUTTERER and SINGER, 1960; WOESSNER, 1961; HANSON and WIEDERANDERS, 1969; PAREKH and JUNG, 1970;

V. Abtrennung störender Begleitkomponenten durch Chromatographie:

- a) Säulenchromatographie: ROGERS et al., 1954; PIEZ et al., 1956; ALEXEENKO and BREKHOVICH, 1960; LEACH, 1961; PARTRIDGE and ELSDEN, 1961; CUCCO, 1962; MEILMANN et al., 1963; Le ROY et al., 1964; SATWEKAR et RADHAKRISHNAN, 1964; STALDER, 1965; FIRSCHEIN and SHILL, 1966; STEGEMANN and STALDER, 1967; BOREL et al., 1967; MORSCHES et al., 1967; HANSON and WIEDERANDERS, 1969; KOEVOET and BAARS, 1969; ARNOLD et al., 1969; TOMASZEWSKI, 1971; CALLAHAN et al., 1972; KIBRICK et al., 1973; CLEARY and SANUDERS, 1974;
- b) Papier- oder Dünn-
schicht-Chromatographie: MYHILL and JACKSON, 1963; TITAEV, 1963; GRAY et al., 1964; MARCUCCI and MUSSINI, 1965; MASKALERIS et al., 1966;
- c) Gaschromatographie: NICHOLLS et al., 1963; BLAU and DABRE, 1965; MUSSINI and MARCUCCI, 1965; MEE, 1973; GIBBS et al., 1974;
- d) Kationenaustauscher-Harz
in Tablettenform: GOVERDE and VEENKAMP, 1972; BURKHARDT et al., 1973; WALSER and SCHOENENBERGER, 1974; ORLOFF et al., 1975.

2. P r o b l e m s t e l l u n g

Die verschiedenen Verfahren zur Bestimmung von Hydroxyprolin, die in der Literatur beschrieben werden (s.Tab.3), beruhen im wesentlichen alle auf dem gleichen Prinzip:

1. Alkalische oder saure Hydrolyse des Untersuchungsmaterials.
2. Abtrennung des Hydroxyprolins von störenden Begleitkomponenten durch Extraktion oder Chromatographie auf verschiedenen Stufen.
3. Photometrische Bestimmung (s. Abb.5)
 - a) Oxidation von Hydroxyprolin zu Pyrrol-2-carbonsäure.
 - b) Dekarboxylierung der Pyrrol-2-carbonsäure zu Pyrrol.
 - c) Reaktion von Pyrrol mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (p-DAB) unter Bildung eines roten Farbkomplexes.
 - d) Photometrische Messung der Extinktion des gebildeten Farbkomplexes.
 - e) Ermittlung der gesuchten Hydroxyprolinkonzentration aus einer Eichkurve.

Es hat sich jedoch gezeigt, wie auch die hohe Anzahl der modifizierten Methoden deutlich macht, daß bei der Hydroxyprolinbestimmung immer noch zwei Hauptprobleme bestehen. Einerseits bereitet es Schwierigkeiten, das zu untersuchende biologische Material ganz von störenden Begleitsubstanzen zu trennen, andererseits ist die colorimetrische Bestimmung noch nicht spezifisch und empfindlich genug. Außerdem sind bei vielen der bisher veröffentlichten Bestimmungs-

methoden die Meßergebnisse von Standardproben nicht immer reproduzierbar, so daß sich für ein und dasselbe Verfahren unterschiedliche Eichkurven ergeben.

Im Hinblick auf die oben erwähnte Problematik der Hydroxyprolinbestimmung werden in der vorliegenden Arbeit die Methodik der photometrischen Bestimmung anhand des von STEGEMANN (1958) beschriebenen Verfahrens noch einmal eingehend untersucht. Dabei sind von besonderem Interesse vor allem die Messung des Absorptionsspektrums des Pyrrol-p-DAB-Farbkomplexes, die Ermittlung geeigneter Oxidations- und Dekarboxylierungszeiten und die Festlegung adäquater Konzentrationen des Oxidations- und Neutralisationsmittels, sowie des Farbreagenzes.

Dazu werden die einzelnen Stufen der Hydroxyprolinbestimmung nach STEGEMANN schrittweise an definierten Hydroxyprolinstandardlösungen untersucht, jeweils mit dem Ziel, eine möglichst hohe Empfindlichkeit und Farbstabilität zu erhalten. Treten dabei Ergebnisse auf, die eine Änderung in der Methode nach STEGEMANN erfordern, finden sie in Form einer Modifikation des Verfahrens im dann folgenden Untersuchungsschritt Verwendung.

Die endgültige Zusammenfassung der einzelnen Ergebnisse führt schließlich zu einem modifizierten Verfahren, dessen Reproduzierbarkeit unter konstanten Versuchsbedingungen untersucht und das abschließend mit anderen Bestimmungsmethoden, insbesondere deren Empfindlichkeit, verglichen wird.

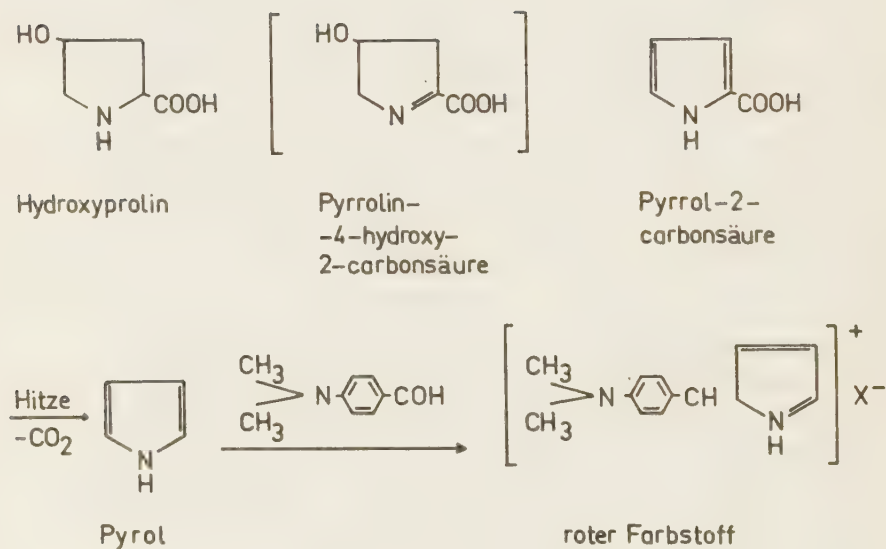


Abb. 5

Prinzip der photometrischen Bestimmung von Hydroxyprolin

3. Experimenteller Teil

3.1. Untersuchung zur photometrischen Messung von Hydroxyprolin

3.1.1. Bestimmung von Hydroxyprolin nach STEGEMANN 1958

Prinzip

STEGEMANN führt die Oxidation von Hydroxyprolin in einem schwach sauren Puffer von etwa pH 6 mit Hilfe von Chloramin-T durch. Nach Bildung des Pyrrols wird die Lösung mit Perchlorsäure angesäuert und somit überschüssiges Chloramin-T zerstört. Die Pyrrol-Farbkomplexbildung wird mit p-Dimethylaminobenzaldehyd durchgeführt. Die Extinktion des gebildeten Farbkomplexes ist proportional dem Hydroxyprolingehalt der Probe.

Reagenzien

Alle Reagenzien sind, wenn nicht anders vermerkt, p.a.-Substanzen der Firma Merck.

0,05 M Chloramin-T-Lösung:

1,41 g Chloramin-T werden in 20 ml aqua dest. und 30 ml dest. Methylcellosolve (A) gelöst und mit Acetat-Citrat-Puffer (B) auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung wird täglich frisch angesetzt.

A) Äthylenglykomonomethyläther (Methylglykol, Methylcellosolve) wird über eine Kolonne destilliert oder als p.a. Lösung verwendet. Das Lösungsmittel ist kühl aufzubewahren.

B) Acetat-Citrat-Puffer pH 6:

In etwa 500 ml aqua dest. werden gelöst: 50 g Citronensäure $\cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$, 12 ml Eisessig, 120 g Natriumacetat, $3 \text{ H}_2\text{O}$ und 34 g Natriumhydroxid. Die Lösung wird auf 1000 ml

mit aqua dest. aufgefüllt und mit 10 Tropfen Toluol versetzt. Bei Lagerung im Kühlschrank ist der Puffer mehrere Monate stabil.

Perchlorsäure (3,15 Mol/l)

27 ml 70 % Perchlorsäure werden ad 100 ml mit aqua dest. verdünnt.

p-Dimethylaminobenzaldehyd - Lösung (p-DAB)

Eine 10 %ige p-DAB-Lösung wird mit dest. Methylcellosolve kurz vor Gebrauch hergestellt.

Hydroxyprolin-Standardlösung

10 mg L-Hydroxyprolin (Hypro) werden in 100 ml aqua dest. gelöst. Diese Lösung ist im Kühlschrank aufzubewahren. Täglich werden Lösungen von 1,2,4,6,8 µg/2 ml durch Verdünnung der Stammlösung mit aqua dest. hergestellt.

Arbeitsvorschrift:

2 ml Probe mit jeweils 1,2,4,6,8 µg Hypro werden in einem mit Schliffstopfen verschließbaren Reagenzglas mit 1 ml Chloramin-T-Lösung versetzt, kurz geschüttelt und 20 Min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend werden 1 ml Perchlorsäure zugegeben, geschüttelt, 5 Min. gewartet, 1 ml p-DAB-Lösung zugefügt und kurz geschüttelt bis die Mischung keine Schlieren mehr aufweist. Schließlich wird in einem Wasserbad von 60° C 15 Min. lang erwärmt und 2 Min. in kaltem Leitungswasser abgekühlt. Die Messungen der Extinktionen werden bei 560 nm als Dreifachbestimmungen gegen einen analog behandelten Leerwert 10 Min. nach Wasserbadentnahme in geeichten Küvetten durchgeführt. Aus den erhaltenen Werten wird eine Eichkurve aufgestellt (Abb.6).

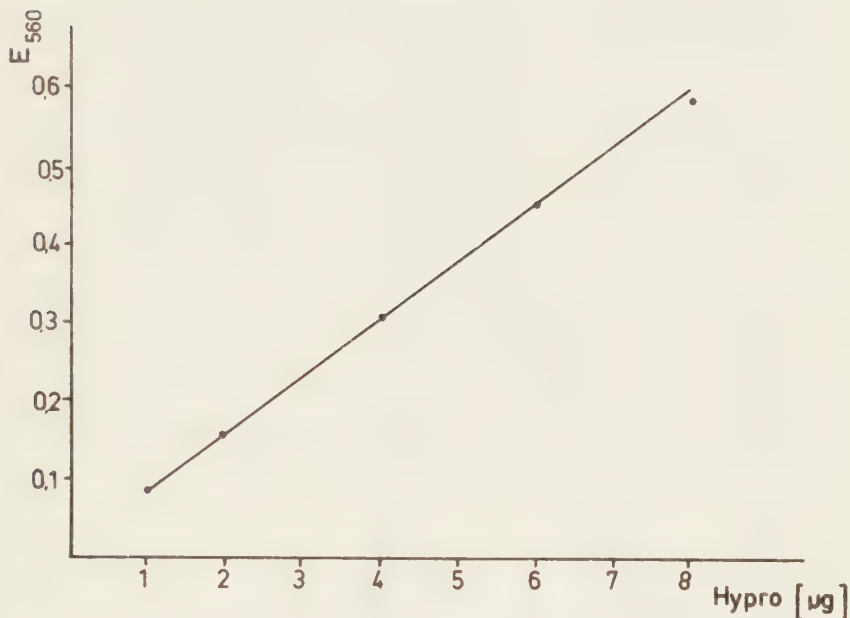


Abb. 6

Eichkurve: Graphische Darstellung der Abhängigkeit der Extinktion von unterschiedlichen Hydroxyprolinkonzentrationen.

3.1.2. Absorptionsspektrum

Um das Absorptionsmaximum des Pyrrol-p-DAB-Farbkomplexes zu ermitteln, werden Hypro-Standardlösungen nach Vorschrift 3.1.1. analysiert und die Extinktionen in einem Meßbereich von 450-650 nm in Abhängigkeit von der Wellenlänge gemessen.

Reagenzien : siehe 3.1.1.

Analysengang : siehe 3.1.1.

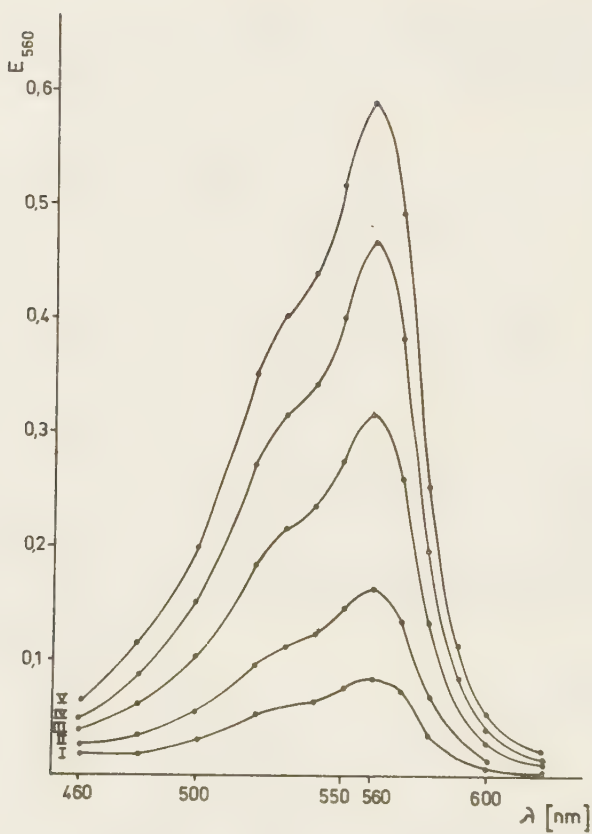


Abb. 7

Graphische Darstellung des Absorptionsspektrums verschiedener Hypro-Standardlösungen.

- I. 1 μ g Hypro/Ansatz
- II. 2 μ g Hypro/Ansatz
- III. 4 μ g Hypro/Ansatz
- IV. 6 μ g Hypro/Ansatz
- V. 8 μ g Hypro/Ansatz

3.1.3. Dekarboxylierungszeit

Nach Arbeitsvorschrift in 3.1.1. soll die zu bestimmende Probe 15 Min. bei 60°C erhitzt werden, damit die Pyrrol-2-carbonsäure vollständig zu Pyrrol dekarboxyliert wird. In diesem Untersuchungsabschnitt soll ermittelt werden, in welchem Maße sich die Dauer der Dekarboxylierungszeit auf die Farbkomplexbildung auswirkt. Dazu werden Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardproben mit unterschiedlichen Erhitzungszeiten in einem Bereich von 5-30 Min. durchgeführt. Anschließend werden die Farbkomplexe mit der größten Farbausbeute auf ihre Stabilität hin untersucht, indem die Extinktionen der betreffenden Proben eine Stunde lang gemessen werden.

Reagenzien u. Analysengang siehe 3.1.1.

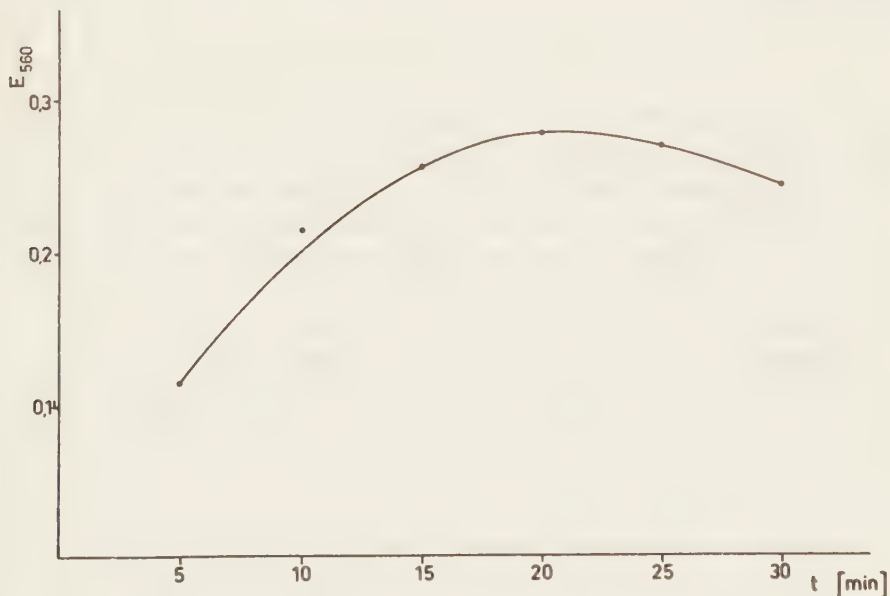


Abb. 8

Graphische Darstellung der Extinktionsänderung bei Bestimmung einer Hydroxyprolinstandardprobe ($4\text{ }\mu\text{g}$ Hypro/Ansatz) mit unterschiedlichen Erhitzungszeiten.

Zeitpunkt der Messung nach Wasserbadentnahme (in Min.) Extinktionen (Mittelwerte) bei Bestimmung von 4 µg Hypro/Ansatz mit unterschiedlichen Erhitzungszeiten (in Min.)

	15	20	25
10	0,263	0,279	0,271
20	0,266	0,279	0,269
30	0,264	0,278	0,265
40	0,263	0,275	0,262
50	0,262	0,271	0,257
60	0,259	0,268	0,253

Tab. 4

Vergleich der Farbstabilität bei Bestimmung von Hydroxyprolin-standardproben mit unterschiedlichen Erhitzungszeiten (Einzelwerte s. Anhang Tab. 12)

3.1.4. Zerstörung überschüssigen Oxidationsmittels

Die Arbeitsvorschrift in 3.1.1. empfiehlt nach der Oxidation eine Zerstörung von überschüssigem Chloramin-T mit 1 ml einer 3,15 molaren Perchlorsäurelösung, die 5 Min. lang einwirken soll. Ein etwaiger Einfluß der Perchlorsäurekonzentration auf die Empfindlichkeit der Hydroxyprolinbestimmung soll in diesem Kapitel durch Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardproben mit unterschiedlich starken Perchlorsäurelösungen untersucht werden.

Reagenzien:

Chloramin-T-Lösung 0,05 Mol/l

Perchlorsäure-Lösung 0,79; 1,58; 3,15; 4,73 Mol/l

p-DAB-Lösung 10 g/100 ml

Analysengang: siehe 3.1.1.

Modifikation: 20 Min. Erhitzung bei 60° C.

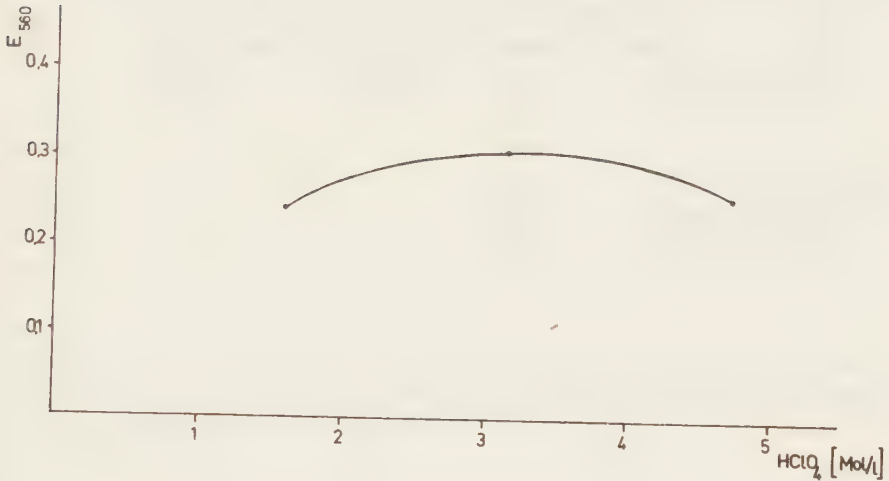


Abb. 9

Graphische Darstellung der Extinktionsänderung bei Bestimmung von Hydroxyprolinstandardlösungen ($4 \mu g$ Hypro/Ansatz) mit unterschiedlichen Perchlorsäurekonzentrationen.

3.1.5. Farbkomplexbildung

Die Farbkomplexbildung erfolgt gemäß Arbeitsvorschrift in 3.1.1. durch Zugabe von 1 ml einer p-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung nach der Zerstörung überschüssigen Oxidationsmittels mit Perchlorsäure. Sie ist durch die Entstehung eines Pyrrol-p-DAB-Komplexes gekennzeichnet, dessen Farbausbeute photometrisch bestimmt wird.

In der folgenden experimentellen Untersuchung soll geklärt werden, ob sich die Höhe dieser Extinktion durch

Änderung der p-DAB-Konzentration vergrößern läßt. Dazu wurden mehrere Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardlösungen mit p-DAB-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen durchgeführt und sowohl die Höhe der jeweiligen Extinktion gemessen als auch die Stabilität der Farbkomplexe untersucht.

Reagenzien:

Chloramin-T-Lösung 0,05 Mol/l

Perchlorsäure-Lsg. 3,15 Mol/l

5; 10; 15; 20; 25 g/100 ml p-DAB-Lsg. (Lösungsmittel: dest. Methylcellosolve)

Analysengang: Grundprinzip siehe 3.1.1.

Modifikation: Erhitzungszeit 20 Min.

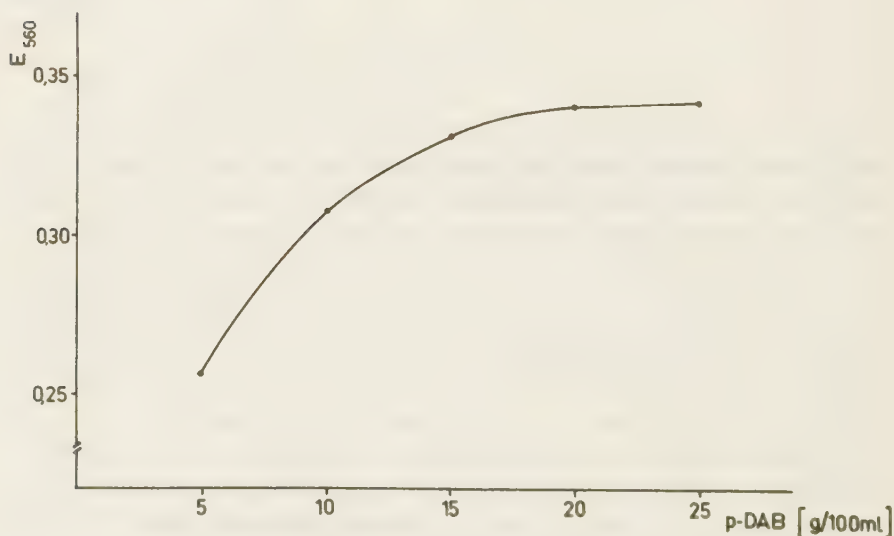


Abb. 10

Graphische Darstellung der Extinktionsänderung bei Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardlösungen ($4 \mu\text{g}$ Hypro/Ansatz) mit p-DAB-Lösungen unterschiedlicher Konzentration.

Zeitpunkt der Messung nach Wasserbadentnahme (in Min.)	Extinktionen (Mittelwerte) bei Bestimmung von 4 µg Hypro/Ansatz
---	--

5	0,346
10	0,348
15	0,349
20	0,349
25	0,349
35	0,350
45	0,346
60	0,346

Tab. 5

Stabilitätsprüfung des Pyrrol-p-DAB-Farbkomplexes bei Bestimmung einer Hydroxyprolinstandardprobe (4 µg Hypro/Ansatz) mit einer relativ hochkonzentrierten p-DAB-Lösung (20 g/100 ml). (Einzelwerte s. Anhang Tab. 15)

3.1.6. Lösungsmittel

STEGEMANN benutzte 1958 bei der Hydroxyprolinbestimmung destillierte Methylcellosolve als Lösungsmittel (s.3.1.1.). Andere Autoren (STEGEMANN u. STALDER, 1957; BERGMAN u. LOXLEY, 1970; CLEARY u. SAUNDERS, 1974) verwenden n- oder iso-Propanol.

Wir haben in den folgenden Untersuchungen Hydroxyprolinanalysen mit dest. Methylcellosolve, n- und iso-Propanol durchgeführt, um etwaige unterschiedliche Einflüsse der Lösungsmittel auf die Farbkomplexbildung feststellen zu können. Gleichzeitig wurde der Gesamtansatz nach Vorschlag von STEGEMANN u. STALDER, (1967) von 5 auf 4 ml reduziert, indem die Perchlorsäure und p-DAB in einer gemeinsamen Lösung angesetzt wurden.

Reagenzien:

- a) Chloramin-T-Lösung 0,05 Mol/l:
1,41 g Chloramin-T
20 ml aqua dest.
30 ml Lösungsmittel
50 ml Acetat-Citrat-Puffer
- b) p-DAB-Perchlorsäure-Lösung:
20 g p-DAB werden in 27 ml
70 % HClO_4 gelöst und auf 100 ml
mit Lösungsmittel aufgefüllt.

Analysengang:

2 ml Probe mit 4 μg Hydroxyprolin werden mit 1 ml Chloramin-T versetzt, kurz geschüttelt und 20 Min. bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wird 1 ml p-DAB-Perchlorsäure-Lösung hinzugegeben und geschüttelt, bis die Mischung keine Schlieren mehr aufweist. Schließlich wird die Probe im Wasserbad von 60° C 20 Min. erwärmt und 2 - 3 Min. in kaltem Leitungswasser abgekühlt. Die Extinktion wird innerhalb einer Stunde nach Wasserbadentnahme alle 10 Min. bei 560 nm gemessen.

3.1.7. Oxidation

Das Bestimmungsverfahren nach STEGEMANN in 3.1.1. schreibt eine 20-minütige Oxidation von Hydroxyprolin bei Raumtemperatur mit 1 ml einer 0,05 molaren Chloramin-T-Lösung vor. In 3.1.7. werden Hydroxyprolinbestimmungen mit unterschiedlichen Chloramin-T-Lösungsmittelkonzentrationen (0,0125 - 0,1 Mol/l) und verschiedenen Oxidationszeiten (5 - 25 Min.) durchgeführt, um zu untersuchen, inwieweit sich Änderungen von Oxidationsmittelkonzentration und Oxidationszeit auf Farbausbeute und Farbstabilität auswirken.

Reagenzien:

a) Chloramin-T-Lösung:

(0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 Mol/l)

0,352 - 0,705 - 1,41 - 2,82 g Chl-T

20 ml aqua dest.

30 ml n-Propanol

50 ml Acetat-Citrat-Puffer

b) p-DAB-Perchlorsäure-Lösung:

20 g p-DAB werden in 27 ml 70 % HClO_4 gelöst und mit n-Propanol auf 100 ml aufgefüllt.

Analysengang: siehe 3.1.6.

Oxidationszeiten: 5;10;15;20 u. 25 Min.

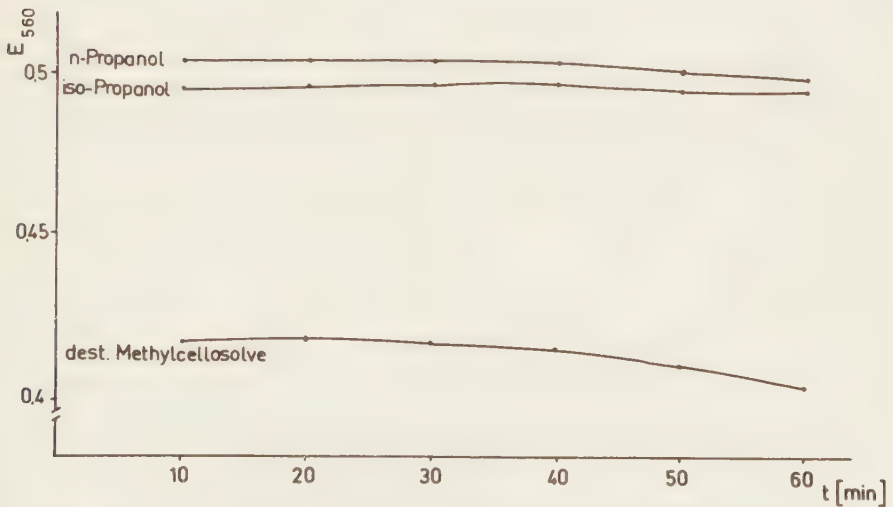


Abb. 11

Graphische Darstellung des Einflusses unterschiedlicher Lösungsmittel auf die Extinktion und Farbstabilität bei Bestimmung von 4 μg Hypro/Ansatz.

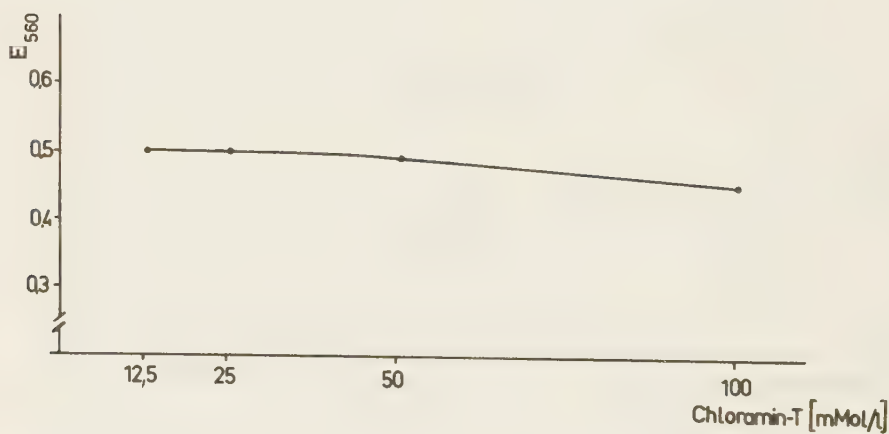


Abb. 12

Graphische Darstellung der Extinktionsänderung bei Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardlösungen (4 μ g Hypro/Ansatz) mit unterschiedlichen Chloramin-T-Konzentrationen.

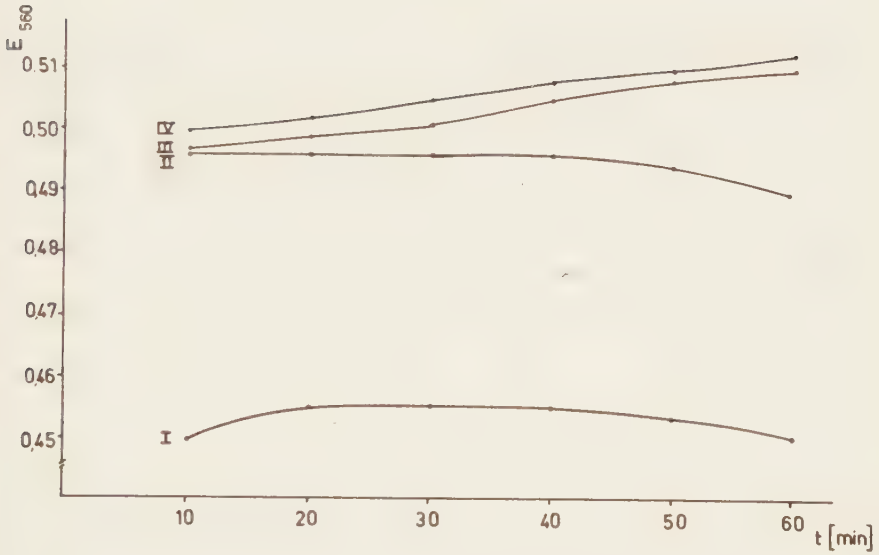


Abb. 13

Graphische Darstellung der Farbstabilität bei Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardlösungen ($4 \mu\text{g}$ Hypro/Ansatz) mit unterschiedlichen Chloramin-T-Konzentrationen.

- I. Chloramin-T-Lsg. : $0,1 \text{ Mol/l}$
- II. Chloramin-T-Lsg. : $0,05 \text{ Mol/l}$
- III. Chloramin-T-Lsg. : $0,025 \text{ Mol/l}$
- IV. Chloramin-T-Lsg. : $0,0125 \text{ Mol/l}$

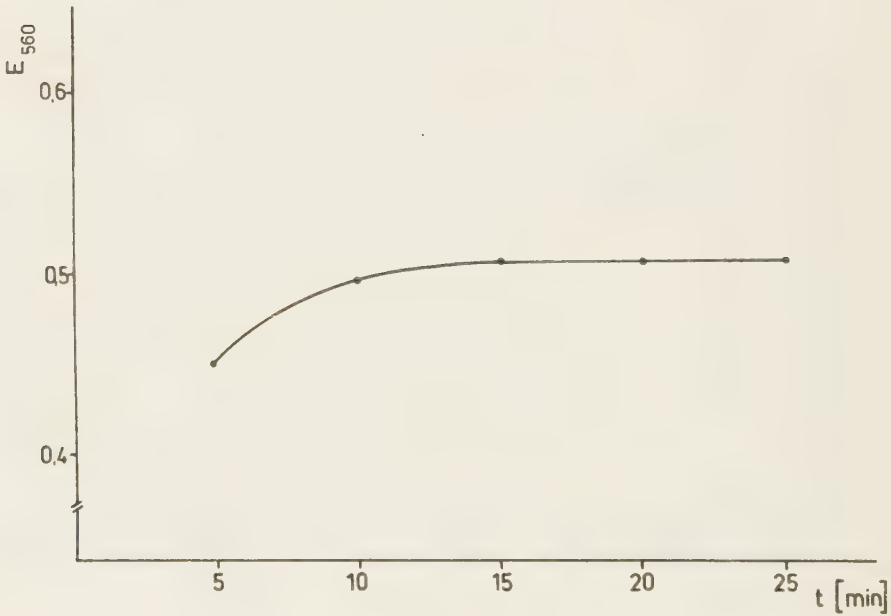


Abb. 14

Graphische Darstellung der Extinktionsänderung bei Bestimmung von Hydroxyprolinstandardproben ($4 \mu\text{g}$ Hypro/Ansatz) mit unterschiedlichen Oxidationszeiten unter Verwendung einer $0,05$ molaren Chloramin-T-Lösung als Oxidationsmittel.

3.2. Modifizierung der Hydroxyprolinbestimmung anhand der Untersuchungsergebnisse

3.2.1. Arbeitsvorschrift

Bei Berücksichtigung aller vorliegenden Ergebnisse, die im einzelnen noch diskutiert werden (s. Seite 41), ergibt sich bei Einhaltung des bereits beschriebenen Grundprinzips der Hydroxyprolinbestimmung (s. Seite 18) folgende neue Arbeitsvorschrift:

Reagenzien:

- a) Chloramin-T-Lösung 0,05 Mol/l:
 - 1,41 g Chl-T
 - 20 ml aqua bidest.
 - 30 ml n-Propanol
 - 50 ml Acetat-Citrat-Puffer pH 6
 - (Die Lösung ist am Gebrauchstag anzusetzen).
- b) p-DAB-Perchlorsäure-Lösung:
 - 20 g p-DAB werden kurz vor Gebrauch in 27 ml
 - 70 % Perchlorsäure gelöst und mit n-Propanol
 - auf 100 ml aufgefüllt.

Analysengang:

2 ml Probe werden mit 1 ml Chloramin-T-Lösung versetzt, kurz geschüttelt und 20 Min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird 1 ml p-DAB-Perchlorsäure-Lösung hinzugegeben und geschüttelt, bis die Mischung keine Schlieren mehr aufweist. Schließlich wird im Wasserbad bei 60°C 20 Min. lang erwärmt und danach 2 - 3 Min. in kaltem Leitungswasser abgekühlt. Stabilitätsprüfungen des Pyrrol-p-DAB-Farbkomplexes nach der neuen Arbeitsvorschrift (s. Tab. 21) haben ergeben, daß die Extinktionsmessung am geeignetsten 10 - 15 Min. nach Wasserbadentnahme bei 560 nm erfolgt. Der Farbkomplex ist ungefähr 40 Min. stabil.

Aufstellen einer Eichkurve:

Bei der Bestimmung von Hydroxyprolinstandardproben ergibt sich eine Eichkurve, die dem Lambert-Beer'schen Gesetz gehorcht.

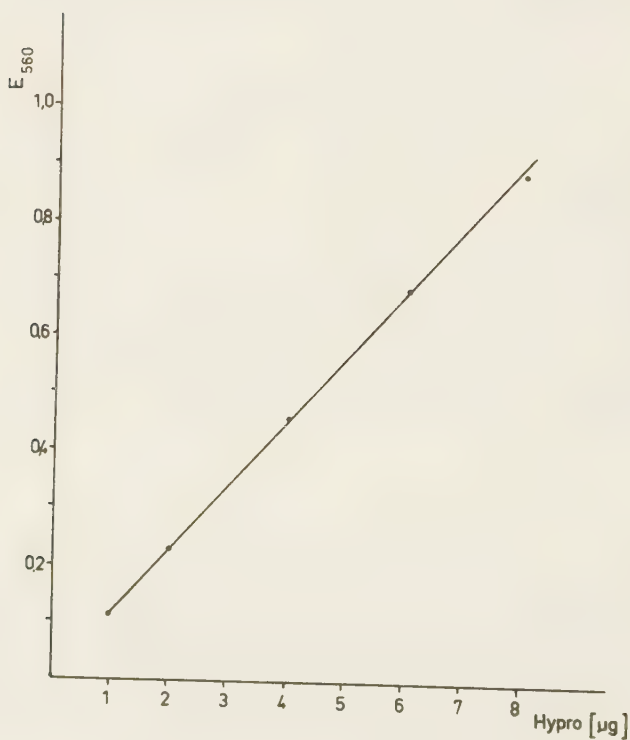


Abb. 15

Eichkurve (Bestimmung von Hydroxyprolinstandardproben mit 1,2,4,6 u. 8 µg Hydroxyprolin im Ansatz nach modifizierter Arbeitsvorschrift).

3.2.2. Reproduzierbarkeit

Um die Reproduzierbarkeit der neuen modifizierten Methode zu prüfen, werden 15 Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardproben unter möglichst konstanten Versuchsbedingungen nach Vorschrift in 3.2.1. durchgeführt und sowohl Variationskoeffizient als auch Standardabweichung ermittelt (s. Tab. 6).

Reagenzien und Analysengang siehe 3.2.1.

Konz. der HP-Standardlsg. ($\mu\text{g}/\text{Ansatz}$)	$\bar{x}$ [Ext.]	s [Ext.]	v [%]
1	0,115	$\pm 0,003$	2,6
2	0,232	$\pm 0,003$	1,3
4	0,457	$\pm 0,004$	0,9
6	0,684	$\pm 0,005$	0,7
8	0,884	$\pm 0,005$	0,6

Tab. 6

Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (s) und Variationskoeffizienten (v) der Extinktionen bei Bestimmung verschiedener Hydroxyprolinstandardlösungen nach dem in 3.2.1. beschriebenen Verfahren (Einzelwerte s. Tab. 22)

3.3. Das modifizierte Verfahren im Vergleich mit anderen Hydroxyprolinbestimmungsmethoden.

Die in 3.2.1. beschriebene Methode zur Hydroxyprolinbestimmung stellt die Zusammenfassung der Ergebnisse

einer experimentellen Analyse des von STEGEMANN 1958 veröffentlichten Verfahrens, insbesondere seine Empfindlichkeit, inform einer Modifikation dar. Um dieses modifizierte Verfahren, insbesondere seine Empfindlichkeit, mit Methoden anderer Autoren vergleichen zu können, wurden aus der relativ großen Anzahl von Veröffentlichungen (s.Tab.3) sechs Bestimmungsmethoden ausgewählt, die für die klinische Routinediagnostik anwendbar und nach Untersuchungen von MITCHELL und TAYLOR, 1970, als relativ empfindlich und reproduzierbar anzusehen sind: STEGEMANN, 1958; PROCKOP und UDENFRIEND, 1960; WOESSNER, 1961; STEGEMANN und STALDER, 1967; BERGMAN und LOXLAY, 1970; CLEARY und SAUNDERS, 1974. Als Grundlage für den Vergleich der oben genannten Verfahren dienen Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardproben, die nach Vorschrift der entsprechenden Autoren durchgeführt und deren Ergebnisse inform von Eichkurven gegenübergestellt werden (s. Abb. 16 und Abb. 17), wobei zusätzlich die empfindlichsten Methoden hinsichtlich der Farbstabilität untersucht werden (s.Tab.7).

Zeitpunkt der Messung nach Wasserbadent- nahme (in Min.)	Extinktionen bei Bestimmung von 4 µg Hydroxyprolin/Ansatz		
	Bergman u. Loxlay, 1970	Cleary u. Saunders, 1974	Eigene Methode
10	0,437	0,568	0,529
20	0,439	0,650	0,528
30	0,440	0,590	0,528
40	0,441	0,610	0,528
50	0,441	0,592	0,522
60	0,440	0,620	0,520

Tab. 7

Vergleich der Farbstabilität bei Bestimmung von Hydroxyprolinstandardproben nach verschiedenen Methoden.

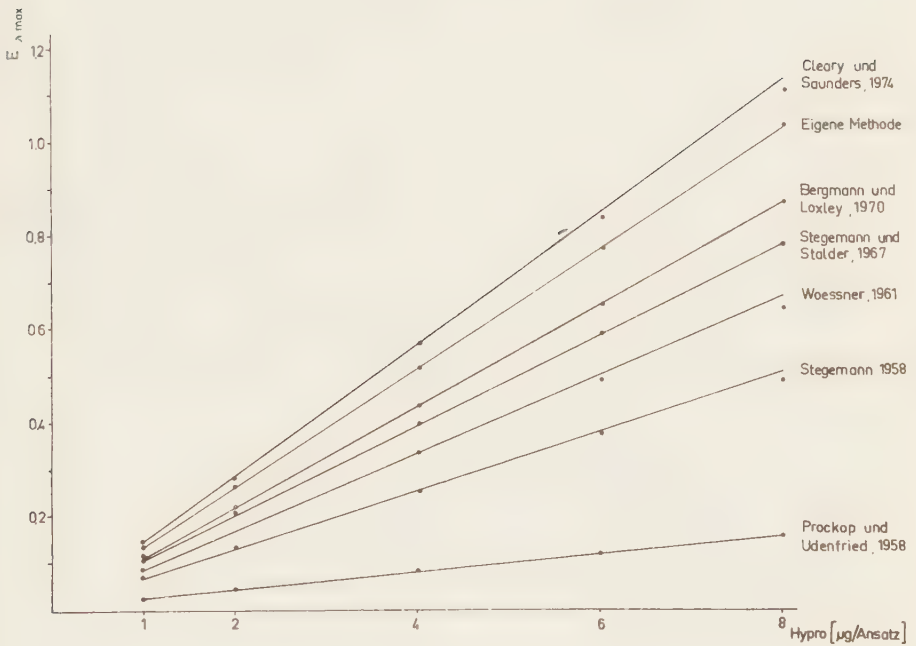


Abb. 16

Eichkurven verschiedener Bestimmungsmethoden:
Graphische Darstellung der Abhängigkeit der Extinktion
von unterschiedlichen Hydroxyprolinkonzentrationen
($\mu\text{g HP/Ansatz}$)

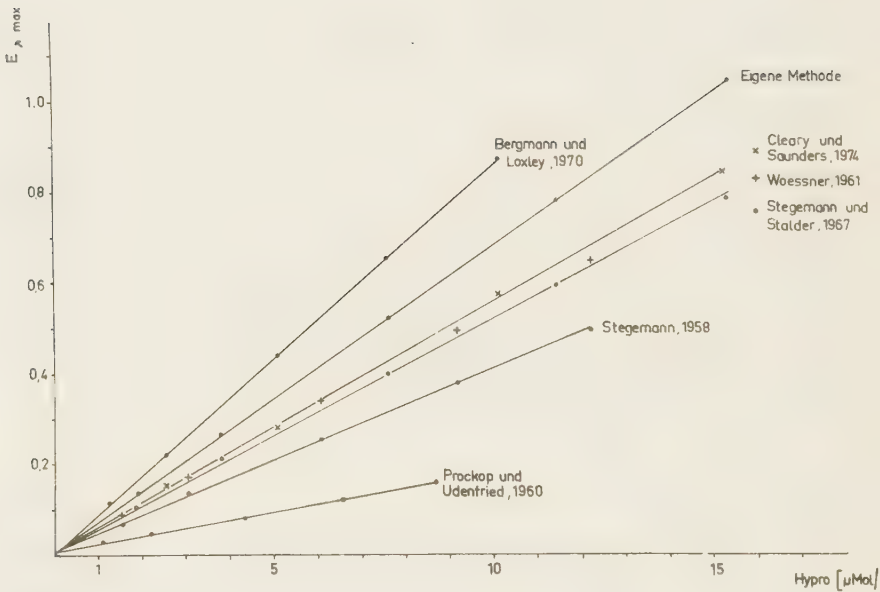


Abb. 17

Eichkurven verschiedener Bestimmungsmethoden:
Graphische Darstellung der Abhängigkeit der Extinktion
von unterschiedlichen Hydroxyprolinkonzentrationen
($\mu\text{ Mol HP/l}$).

4. E r g e b n i s s e u n d D i s k u s s i o n

In der vorliegenden Arbeit wurden die einzelnen Stufen der photometrischen Bestimmung von Hydroxyprolin untersucht und dabei das Prinzip der von STEGEMANN 1958 entwickelten Methode zugrunde gelegt:

a) Oxidation

von Hydroxyprolin zu Pyrrol-2-carbonsäure mit Chloramin-T

b) Farbkomplexbildung

Zerstörung überschüssigen Oxidationsmittels mit Perchlorsäure.

Dekarboxylierung der Pyrrol-2-carbonsäure zu Pyrrol durch Erhitzung im Wasserbad.

Reaktion von Pyrrol mit p-Dimethylaminobenzaldehyd unter Bildung eines roten Farbkomplexes.

Es wurde jeweils versucht, durch Veränderung von Reagenzkonzentrationen und Reaktionszeiten photometrisch auswertbare Farbkomplexe zu erhalten, die sich durch hohe Extinktionen, Linearität in einem weiten Bereich und Stabilität auszeichnen. Durch die aufgrund der dabei gewonnenen Ergebnisse vorgenommenen Modifikationen des Verfahrens nach STEGEMANN (1958) ergab sich eine Hydroxyprolinbestimmungsmethode, die auf Linearität, Stabilität und Reproduzierbarkeit überprüft und anschließend mit anderen empfindlichen Verfahren verglichen wurde.

Die im experimentellen Teil aufgeführte Überarbeitung der Hydroxyprolinbestimmung und die dabei gewonnenen Ergebnisse, die ihren Ausdruck in einer neuen Methode finden, können in Hinblick auf eine entsprechende Dis-

kussion in mehrere Abschnitte unterteilt werden, wobei der abschließende Vergleich mit anderen Bestimmungsverfahren dazu dienen soll, für die klinisch-chemische Routine ein adäquates Verfahren zu finden.

4.1. Oxidation von Hydroxyprolin

In der Vergangenheit sind verschiedene Oxidationsmittel zur Oxidation von Hydroxyprolin verwandt worden:

Natriumhypochlorid (LANG, 1933; WALDSCHMITT-LEITZ und AKABORI, 1943), Natriumperoxid (Mc FARLANE und GUEST, 1939; NEUMAN und LOGAN, 1949) und Natriumhypobromid (KIVIRIKKO und LIESMAA, 1959; KIVIRIKKO, 1963).

In unseren Untersuchungen wurde das von STEGEMANN 1958 eingeführte Oxidationsmittel Chloramin-T (Natrium-Toluol-p-Sulfonchloramid) zur Oxidation benutzt. Die Reaktion beruht dabei im wesentlichen auf einer Umwandlung des Hydroxyprolins über die Pyrrolin-4-hydroxy-2-carbonsäure in Pyrrol-2-carbonsäure (RADHAKRISHNAN und MEISTER, 1957). Diese Oxidation wird von den einzelnen Autoren jedoch bei unterschiedlichem pH-Wert, mit unterschiedlichen Chloramin-T-Konzentrationen und Oxidationszeiten durchgeführt (s. Tab. 8). Einige oxidieren Hydroxyprolin im sauren Milieu eines Acetat-citrat-Puffers (pH 6) mit einer 0,05 molaren Chloramin-T-Lösung (entsprechend 0,017 Mol/l im Ansatz) 20 Min. lang bei Zimmertemperatur (STEGEMANN, 1958; WOESSNER, 1961; STEGEMANN und STALDER, 1967). BERGMAN und LOXLAY (1963) arbeiten mit einer 0,012 molaren Chloramin-T-Konzentration im Ansatz. Sie stellen unter diesen Bedingungen fest, daß die Farbausbeute zwischen 2 und 30 Min. relativ unabhängig von der Oxidationszeit ist und empfehlen eine Reaktionszeit

von 4 ± 1 Minuten. CLEARY und SAUNDERS haben die Oxidationsbedingungen von BERGMAN und LOXLEY (1970) auf die Oxidation ihres Säuleneluates angewandt und optimale konstante Ergebnisse bei 2 - 6 minütiger Oxidation mit einer 0,045 molaren Chloramin-T-Lösung erzielt, entsprechend einer Konzentration von 0,011 Mol/l im Ansatz. PROCKOP und UDENFRIEND finden, daß Chloramin-T bei pH 8,7 löslicher ist und oxidieren im alkalischen Milieu eines Kaliumboratpuffers Hydroxyprolin in gereinigter Lösung mit einer 0,02 molaren, Hydroxyprolin in biologischen Materialien mit einer 0,2 molaren Chloramin-T-Lösung 20 Min. lang bei Zimmertemperatur (PROCKOP und UDENFRIEND, 1960).

Bei unseren Untersuchungen wurde im schwach sauren Milieu eines Acetat-Citrat-Puffers gearbeitet. Dabei stellten wir bei einer Oxidationszeit von 20 Min. eine Zunahme der Extinktion fest, nachdem die Konzentration der Chloramin-T-Lösung von 0,1 auf 0,05 Mol/l vermindert wurde. Messungen nach Verwendung von 0,025- und 0,0125 molaren Oxidationslösungen ergaben keine wesentliche Erhöhung der Farbausbeute mehr (s. Abb. 12). Eine optimale Stabilität des Farbkomplexes ließ sich ebenfalls nach Oxidation von Hydroxyprolin mit einer 0,05 molaren Chloramin-T-Lösung erzielen (s. Abb. 13), während die Extinktion bei Anwendung von niedrigen Chloramin-T-Konzentrationen nach Entnahme der Probe aus dem Wasserbad noch für längere Zeit ansteigt.

Extinktionsmessungen nach Hydroxyprolinbestimmung mit unterschiedlichen Oxidationszeiten von 5 - 25 Min. zeigten eine deutliche Zunahme der Farbausbeute bei Verlängerung der Oxidationszeit von 5 bis zu 15 Minuten, wohingegen nach noch längerer Oxidationszeit keine weitere Extinktionserhöhung mehr erreicht werden konnte (s. Abb. 14).

Aufgrund dieser Ergebnisse und in Anlehnung an andere Autoren (STEGEMANN, 1958; WOESSNER, 1961; STEGEMANN u. STALDER, 1967) empfiehlt sich eine Oxidation mit einer 0,05 molaren Chloramin-T-Lösung. Dieses entspricht einer Konzentration von 0,017 Mol/l im Reaktionsansatz. Obwohl eine Oxidation von 15 Min. bereits zu einer optimalen Farbausbeute führt, bedienen wir uns einer 20-minütigen Oxidationszeit, um bei Serienmessungen einen ausreichend großen Spielraum im Arbeitsablauf gewährleisten zu können.

4.2. Farbkomplexbildung

Nachdem durch Oxidation von Hydroxyprolin Pyrrol-2-Carbonsäure gebildet worden ist, wird zunächst überschüssiges Oxidationsmittel mit Perchlorsäure oder Thiosulfat zerstört und die Pyrrol-2-Carbonsäure anschließend zu Pyrrol dekarboxyliert. Pyrrol läßt man nun mit p-Dimethylaminobenzaldehyd reagieren, wobei ein roter Farbkomplex gebildet wird, dessen Farbausbeute spektrometrisch gemessen werden kann.

Diese Methode der Farbkomplexbildung ist im Prinzip bei allen Hydroxyprolinbestimmungsverfahren gleich, allerdings bestehen Unterschiede in der Konzentration der Perchlorsäure, der einzuhaltenden Dekarboxylierungszeit und der Konzentration des Farbreagenzes. Zudem wird die Farbausbeute bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen. Tabelle 8 zeigt, daß sehr unterschiedliche Perchlorsäurekonzentrationen zur Zerstörung überschüssigen Oxidationsmittels benutzt werden, obwohl annähernd gleiche Mengen von Chloramin-T zur Anwendung kommen. STEGEMANN (1958)

läßt 1 ml einer 4-molaren Perchlorsäurelösung mit überschüssigem Oxydationsmittel reagieren, entsprechend einer Konzentration der Perchlorsäure von 1 Mol/l im Reaktionsansatz. WOESSNER stellt 1961 fest, daß sich bei gleichem Reaktionsansatz höhere Extinktionen mit 2,4 bis 2,6-molaren Perchlorsäurelösungen erzielen lassen, empfiehlt aber der besseren Farbstabilität wegen eine 3,15 molare Lösung. Die von BERGMAN und LOXLAY (1970) und CLEARY und SAUNDERS (1974) benutzten Perchlorsäurekonzentrationen liegen jedoch niedriger, allerdings ist hier auch die Menge des Oxidationsmittels geringer (siehe Tab. 8).

Wir haben in unseren Untersuchungen versucht, durch Anwendung adäquater Perchlorsäurekonzentrationen eine möglichst hohe Farbausbeute zu erzielen. Dazu wurden Hydroxyprolinbestimmungen mit 0,79-; 1,58-; 3,15- und 4,73-molaren Perchlorsäurelösungen durchgeführt (s.3.1.4.). Die Bestimmung von Hydroxyprolin unter Benutzung einer 0,79 molaren Perchlorsäurelösung konnte nicht durchgeführt werden, da es im Reaktionsansatz zu einer Ausfällung kam. In der weiteren Versuchsreihe mit höheren Perchlorsäurekonzentrationen erzielten wir die höchste Farbausbeute unter Anwendung einer 3,15 molaren Perchlorsäure, Bestimmungen mit einer 4,73 molaren Lösung führten bereits wieder zu schlechteren Ergebnissen (siehe Abb. 9).

Auch hinsichtlich der anschließenden Dekarboxylierung der Pyrrol-2-Carbonsäure zu Pyrrol durch Erhitzung im Wasserbad und anschließender Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd unter Bildung eines roten Farbkomplexes bestehen unterschiedliche Vorschriften.

STEGEMANN (1958) hält eine Farbkomplexbildung mit einer 10 %igen p-DAB-Lösung für ausreichend. PROCKOP und UDENFRIEND (1960) erhitzen die Pyrrol-2-Carbonsäure bei 60⁰ C

25 Minuten lang und lassen das gebildete Pyrrol mit einer 28 %igen p-DAB-Lösung reagieren. WOESSNER (1961) findet eine optimale Farbentwicklung bei einer Erhitzungszeit von 20 Min. unter Verwendung einer 20 %igen p-DAB-Lösung. Weitere unterschiedliche Bestimmungsvorschriften (siehe Tab. 8) haben uns veranlaßt, Hydroxyprolinbestimmungen bei 60° C mit Dekarboxylierungszeiten von 5 bis 30 Min. (s. 3.1.3.) und verschieden starken p-DAB-Lösungen mit Konzentrationen von 5 bis 25 g/100 ml durchzuführen (s. 3.1.5.).

Dabei wurde ein Extinktionsmaximum bei 20-minütiger Erhitzung gefunden (s. Abb. 8). Untersuchungen der Farbstabilität bei unterschiedlich langer Erhitzung von 15, 20 und 25 Min. zeigten zudem noch eine relativ gute Stabilität des Pyrrol-p-DAB-Farbkomplexes bis zu 40 Min. nach Wasserbadentnahme (s. Tab. 4).

Die in 3.1.5. durchgeführten Hydroxyprolinbestimmungen machen die Abhängigkeit der Farbausbeute von der jeweiligen Konzentration der p-DAB-Lösung deutlich (s. Abb. 10). Wir fanden, daß es unter Anwendung von 5 bis 15 %igen p-DAB-Lösungen zunächst zu einem steilen Anstieg der Extinktion kommt. Die besten und nahezu gleichen Ergebnisse ließen sich mit 20- und 25 %igen Aldehydlösungen erzielen. Da bei Benutzung einer 20 %igen p-DAB-Lösung und 20-minütiger Dekarboxylierung ein relativ stabiler Farbkomplex gewonnen wird (s. Tab. 5), halten wir eine Farbkomplexbildung unter diesen Bedingungen für optimal.

4.3. Reaktionsmilieu

Die von STEGEMANN (1958) eingeführte Oxidation im schwach sauren Puffer hat sich allgemein durchgesetzt. Auch wir

haben bei unserer Untersuchung Hydroxyprolin bei pH 6 oxidiert.

Als Lösungsmittel werden neben destillierter Methylcellosolve n-Propanol und iso-Propanol benutzt. NEUMAN und LOGAN (1950) verwenden n-Propanol und auch in folgenden Modifikationen ihrer Methode werden organische Lösungsmittel benutzt, um das Aldehyd bei dem für die Farbstabilität notwendigen Säuregrad löslich zu halten (BERGMAN und LOXLAY, 1963). STEGEMANN schreibt 1958 destillierte Methylcellosolve als Lösungsmittel vor, das von anderen Autoren übernommen wurde (PROCKOP und UDENFRIEND, 1960; WOESSNER, 1961). Bergman und LOXLAY ersetzen es 1963 durch iso-Propanol, da sie Methylcellosolve verantwortlich halten für niedrige Farbausbeute und die Instabilität der anzusetzenden Reagenzien. STEGEMANN und STALDER (1967) sehen die von Bergman und LOXLAY festgestellte Instabilität eher als Folge einer nicht sorgfältigen Destillation, ersetzen jedoch Methylcellosolve durch n-Propanol, um die lästige Destillation zu vermeiden.

Bei unseren Untersuchungen wurden Bestimmungen von Hydroxyprolin-Standardproben mit den drei erwähnten Lösungsmitteln durchgeführt (s. 3.1.6.). Gleichzeitig wurde der Gesamtansatz nach STEGEMANN und STALDER (1967) von 5 auf 4 ml reduziert, indem die Perchlorsäure und p-DAB in einer gemeinsamen Lösung angesetzt wurden, wodurch der Analysengang wesentlich vereinfacht werden konnte. Die bei diesen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse wurden in Abb. 11 graphisch dargestellt. Man sieht, daß bei Hydroxyprolinbestimmung unter Verwendung von n-Propanol als Lösungsmittel die höchsten Extinktionen gewonnen werden. Zudem ist der dabei gewonnene Farb-

komplex relativ stabil. Obwohl ähnlich gute Ergebnisse auch mit iso-Propanol als Lösungsmittel erzielt werden konnten, erschien uns n-Propanol wegen seines höheren Siedepunktes und seiner geringeren Flüchtigkeit für den Analysengang, insbesondere für die Erhitzung im Wasserbad, geeigneter als iso-Propanol, das relativ schnell verdunstet.

4.4. Absorptionsspektrum

Das Absorptionsspektrum des bei der Reaktion von Pyrrol und p-Dimethylaminobenzaldehyd gebildeten Farbkomplexes ist bereits von BERGMAN und LOXLAY gründlich untersucht worden. Sie schreiben zur Messung der Extinktion eine Wellenlänge von 560 nm vor (BERGMAN und LOXLAY, 1963). In den näher von uns untersuchten Bestimmungsverfahren variieren die Angaben über das Absorptionsmaximum von 550 bis 562 nm (s. auch Tab. 8). MITCHELL und TAYLOR haben die Absorptionsspektren verschiedener Methoden verglichen und eine auffallende Übereinstimmung festgestellt, die sich in einer Spitze bei 560 nm und einer Schulter bei 525 nm zeigte (MITCHELL und TAYLOR, 1970). Wir können das von MITCHELL und TAYLOR beschriebene Absorptionsspektrum aufgrund unserer Untersuchung in 3.1.2. bestätigen (s. Abb.7). Zudem ergeben die Reagenzien selbst eine relativ geringe Absorption bei einer Wellenlänge von 560 nm ($E = 0,025$, photometrische Messung Leerwert gegen aqua destillata), so daß wir für die photometrische Messung von Pyrrol-p-DAB-Farbkomplexen eine Wellenlänge von 560 nm am geeignetsten halten.

4.5. Modifizierung des STEGEMANN'schen Verfahrens

Die im experimentellen Teil gewonnenen Ergebnisse, die bereits eingehend diskutiert wurden, haben uns veranlaßt, eine neue Arbeitsvorschrift aufzustellen (s.3.2.). Sie entspricht zwar im Grundprinzip der Vorschrift nach STEGEMANN, 1958, weicht doch in einzelnen Schritten von dieser ab.

In dieser Arbeitsvorschrift wird eine 2 ml-Probe mit Hydroxyprolin zunächst mit 1 ml einer 0,05 molaren Chloramin-T-Lösung 20 Min. lang bei Zimmertemperatur oxidiert, wie es auch STEGEMANN vorschreibt. Zur anschließenden Zerstörung überschüssigen Oxidationsmittels benutzen wir jedoch anstelle einer 4-molaren eine 3,15 molare Perchlorsäurelösung. Zudem wird diese Lösung zusammen mit dem Farbreagensatz in einem Ansatz angesetzt, so daß das Verfahren erleichtert wird und um 5 Min. verkürzt werden kann, ohne daß Empfindlichkeit und Stabilität beeinträchtigt werden. Die Farbkomplexbildung wird mit einer 20 %igen p-DAB-Lösung 20 Min. lang bei Zimmertemperatur durchgeführt, so daß sich auch hier wesentliche Unterschiede zur Arbeitsvorschrift von STEGEMANN, 1958 (s. Tab. 8) ergeben. Die Extinktionsmessung empfehlen wir am geeignetsten etwa 10 Min. nach Wasserbadentnahme bei 560 nm durchzuführen, weil dann für ca. 40 Min. eine ausreichende Stabilität gewährleistet ist (s. Tab.21). Die Eichkurve, die wir nach Bestimmung von Hydroxyprolin-Standard-Proben mit 1,2,4,6 und 8 µg Hydroxyprolin im Ansatz aufgestellt haben, erweist sich als nahezu linear bis zu einer Hydroxyprolinkonzentration von 8 µg im Ansatz (s. Abb. 15). Die Bestimmung von 15 Hydroxyprolin-Standardlösungsserien unter konstanten Versuchs-

bedingungen nach Vorschrift in 3.2.2. und die anschließende Berechnung des Variationskoeffizienten und der Standardabweichung (s. Tab. 6) zeigt, daß das Verfahren mit einer Standardabweichung der gemessenen Extinktionen von maximal 0,005 und einem Variationskoeffizienten, der auch bei niedrigen Hydroxyprolinkonzentrationen von 1 µg/Ansatz nicht über 2,6 % liegt, für die klinische Routinebestimmung durchaus akzeptabel ist.

4.6. Vergleich verschiedener Methoden

Die Empfindlichkeit der Methode erwies sich bei einem mittleren mikromolaren Extinktionskoeffizienten von 59.560 [$\frac{1}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}}$] als sehr gut und veranlaßte uns, einen Vergleich unseres Verfahrens mit anderen Methoden durchzuführen, die uns ebenso für die klinische Routinediagnostik geeignet erschienen (s. 3.3.). Um unsere Verfahren mit den Methoden anderer Autoren vergleichen zu können, wurden 6 Bestimmungsmethoden ausgewählt, die auch nach Untersuchungen von MITCHELL und TAYLOR (1970) als relativ empfindlich und reproduzierbar anzusehen sind: STEGEMANN, 1958; PROCKOP und UDENFRIEND, 1960; WOESSNER, 1961; STEGEMANN und STALDER, 1967; BERGMAN und LOXLAY, 1970; CLEARY und SAUNDERS, 1974.

Es wurden Bestimmungen von Hydroxyprolin-Standardproben nach Vorschrift der entsprechenden Autoren durchgeführt und deren Ergebnisse inform von Eichkurven gegenübergestellt. Abb. 16 zeigt die Gegenüberstellung von Eichkurven, die die Empfindlichkeit der jeweiligen Methoden in Abhängigkeit von der Hydroxyprolinkonzentration im Ansatz widerspiegeln. Dabei ist jedoch zu

berücksichtigen, daß aufgrund der vorschriftsmäßigen Bestimmung die Reaktionsansätze unterschiedliche Volumina aufweisen (s. auch Tab.8).

In dieser graphischen Darstellung zeichnet sich die Eichkurve, die nach unserer Arbeitsvorschrift aufgestellt wurde, durch eine relativ hohe Steigung, d.h. Empfindlichkeit und Linearität bis in Konzentrationsbereiche von 8 μg Hydroxyprolin/Ansatz aus. Lediglich das Bestimmungsverfahren von CLEARY und SAUNDERS (1974) führt zu einer Eichkurve mit einer noch höheren Steigung, folgt bei höheren Hydroxyprolinkonzentrationen jedoch nicht mehr dem LAMBERT-BEER'schen Gesetz, sondern flacht ab, so daß genaue Ergebnisse bei Bestimmungen von höheren Hydroxyprolinkonzentrationen nach diesem Verfahren nicht zu erwarten sind. Das von BERGMAN und LOXLAY (1970) entwickelte Verfahren weist eine geringere Farbausbeute auf (s. Abb.16). Die Eichkurven der übrigen untersuchten Bestimmungsmethoden haben eine noch geringere Steigung und entsprechen damit nicht den Anforderungen in Bezug auf die Empfindlichkeit, wie sie heute bei der Hydroxyprolinbestimmung erwartet werden.

Die in Abb. 17 dargestellten Eichkurven der o.g. Bestimmungsmethoden spiegeln jeweils die Farbausbeute wieder, die sich auf eine mikromolare Hydroxyprolinkonzentration und somit auf eine durchaus vergleichbare Konzentrationsmenge bezieht. Dabei zeigt sich, daß die von BERGMAN und LOXLAY 1970 entwickelte Methode empfindlicher ist als das von uns vorgeschlagene Verfahren, die Farbausbeute bei Hydroxyprolinbestimmungen nach CLEARY und SAUNDERS (1974) liegen hier jedoch niedriger.

Abb. 16 und 17 machen insgesamt deutlich, daß die Farbausbeute bei Hydroxyprolinbestimmungen nach BERGMAN und

LOXLAY (1970), CLEARY und SAUNDERS (1974) und nach unserer Methode wesentlich höher ist als bei den anderen untersuchten Verfahren. Die Prüfung der Farbstabilität der bei diesen 3 Methoden gebildeten Pyrrol-p-DAB-Farbkomplexe (s. Tab. 7) ergab jedoch eine relativ starke Schwankung der während einer Stunde nach Wasserbadentnahme gemessenen Extinktionen bei Anwendung der Methode von CLEARY und SAUNDERS (1974).

Die Farbstabilität bei BERGMAN und LOXLAY und unserer Methode war dagegen gut. Obwohl das von BERGMAN und LOXLAY (1970) entwickelte Verfahren zur Hydroxyprolinbestimmung empfindlicher ist als die von uns vorgeschlagene Methode, weist sie dennoch einige Nachteile gegenüber unserem Verfahren auf. So ist zum einen die Standardabweichung des mittleren mikromolaren Extinktionskoeffizienten höher als bei unserer Methode (s. Tab.8), zum anderen dauert die Hydroxyprolinbestimmung nach BERGMAN und LOXLAY wesentlich länger, da die Farbausbeute erst 1 Stunde nach Wasserbadentnahme gemessen werden kann. Aus diesen Gründen haben wir uns entschlossen, die in 3.2.1. beschriebene Methode in der klinisch-chemischen Routinediagnostik weiter zu erproben und sie besonders bei der Hydroxyprolinbestimmung im Urin in Zusammenhang mit einer entsprechenden Abtrennung von störenden Begleitsubstanzen und einer Hydrolyse zur Anwendung zu bringen.

Autor	STEGEMANN, 1958	PROCKOP u. UDENFRIEND, 1960 (II)	WOESSNER, 1961 (I)
Lösungsmittel	Methylcell.	Methylcell.	Methylcell.
Konz. % v/v	26		26
Puffer	Acetat-Citrat pH 6	K-Borat pH 8,7	Acetat-Citrat pH 6
Oxidationsmittel	Chloramin-T	Chloramin-T	Chloramin-T
Konz.d.Lösung [Mol/l]	0,050	0,20	0,050
Konz.im Ansatz [Mol/l]	0,017	0,03	0,017
Oxidationszeit (Min.)	20	20	20
"Neutralisations- mittel"	HClO ₄	Thiosulfat	HClO ₄
Konz.der Lösg. [Mol/l]	4	3,6	3,15
Konz. im Ansatz [Mol/l]	1	1,14	0,79
p-DAB-Lösung [g/100 ml]	10	28	20
Konz. im Ansatz [g/100 ml]	2	8	4
Temperatur °C	60	100	60
Erhitzungszeit [Min]	15	25	20
Aldehyd-Reduk- tionsm.	getrennt	getrennt	getrennt
Absorptionsmaxi- mum [nm]	560	560	557
Endvolumen [ml]	5	7	5
Mittl.mikro-mola- rer Extinktions- koeffizient	42540 ⁺ 1769	20000 ⁺ 2305	54820 ⁺ 1354
$\frac{1}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}}$			
Durchschnittliche Analysendauer bei Hydroxyprolinstan- dardlösungen	40	90	50

Tab. 8

Analyse verschiedener Hydroxyprolinbestimmungsverfahren.

STEGEMAN u.
STALDER, 1967

BERGMAN u.
LOXLAY, 1970 (A)

CLEARY u.
SAUNDERS, 1974

Eigene
Methode

n-Propanol
25
Acetat-Citrat pH 6

iso-Propanol
59
Acetat-Citrat pH 6

iso-Propanol
68
Acetat-Citrat pH 6

n-Propanol
26
Acetat-Citrat pH 6

Chloramin-T

0,050

0,017

20

HClO_4

3,15

0,79

Chloramin-T

0,05

0,012

4

HClO_4

1,59

0,53

Chloramin-T

0,45

0,011

4 - 6

HClO_4

0,70

0,17

Chloramin-T

0,050

0,017

20

HClO_4

3,15

0,79

15

3,75

60

15

gemischt

17,6

5,73

60

21

gemischt

10

3,33

80

4

gemischt

20

5

60

20

gemischt

550

4

562

6

560

3

560

4

53060⁺1604

87140⁺1516

56220⁺1333

68840⁺929

35

85

13

60

5. Zusammenfassung

Die Aminosäure Hydroxyprolin stellt aufgrund ihres spezifischen Vorkommens im Kollagen eine natürliche Markierung dieses Skleroproteins dar. Sie tritt sowohl beim Um- als auch beim Abbau des Kollagens im Serum bzw. Plasma als freie, peptid- und proteingebundene Aminosäure auf und liegt nach Ausscheidung im Urin zu 95 % als peptidgebundene Aminosäure vor. Der Hydroxyprolingehalt im Serum und die Hydroxyprolinausscheidung im Urin spiegeln den Stoffwechsel des Kollagens wieder und können somit unter bestimmten Voraussetzungen als diagnostische Parameter bei verschiedenen Krankheiten herangezogen werden, die mit einem pathologischen Um- oder Abbau von Kollagen einhergehen, wie unter anderem Knochen-, Bindegewebs-, Haut- und einige endokrinologische Erkrankungen.

Grundsätzlich kann Hydroxyprolin im Gewebe, im Urin und im Serum gemessen werden. Dabei beruhen die bisher bekannten Verfahren zur Hydroxyprolinbestimmung im Prinzip alle auf der gleichen Methode: Nach Trennung von störenden Begleitsubstanzen wird das Untersuchungsmaterial hydrolysiert, Hydroxyprolin oxidiert, dekarboxyliert und schließlich einer Reaktion mit einem Farbkomplexbildner zugeführt, um anschließend eine photometrische Messung des gebildeten Farbkomplexes durchführen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, für die klinisch-chemische Routinediagnostik ein adäquates Verfahren für die Hydroxyprolinbestimmung zu entwickeln, das möglichst empfindlich, reproduzierbar und in der Routineanwendung einfach durchzuführen sein sollte. Dazu wurden auf der Grundlage des von STEGEMANN (1958) entwickelten Verfahrens die wichtigsten Parameter der Methode hinsichtlich Reagenzien, ihrer Konzentrationen und Reaktionszeiten schritt-

weise untersucht und aus den dabei gewonnenen Ergebnissen eine neue Methode entwickelt, die mit anderen Hydroxyprolinbestimmungsverfahren, insbesondere denen von BERGMAN und LOXLAY (1970) und CLEARY und SAUNDERS (1974) verglichen wurde. Bei diesem Vergleich erwies sich unser neuentwickeltes Verfahren aufgrund auffallender Empfindlichkeit, geringer Standardabweichung und Reproduzierbarkeit für die Anwendung im klinisch-chemischen Labor als durchaus geeignet.

6. A n h a n g

Hypro/Ansatz	1 µg	2 µg	4 µg	6 µg	8 µg
Extinktionen	0,086	0,162	0,310	0,448	0,590
	0,085	0,158	0,307	0,456	0,592
	0,086	0,158	0,312	0,458	0,594
$\bar{x}$	0,086	0,159	0,310	0,454	0,592

Tab. 9

Extinktionen bei Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardproben.

Methode nach STEGEMANN, 1958. (s. 3.1.1. Abb.6)

Wellenlänge nm	Hypro/Ansatz				
	1 µg	2 µg	4 µg	6 µg	8 µg
450	0,024	0,036	0,042	0,046	0,054
460	0,018	0,027	0,039	0,050	0,064
470	0,018	0,028	0,046	0,064	0,087
480	0,020	0,035	0,062	0,088	0,117
490	0,026	0,044	0,082	0,117	0,154
500	0,030	0,054	0,105	0,153	0,200
510	0,038	0,072	0,138	0,204	0,266
520	0,052	0,098	0,186	0,274	0,353
530	0,060	0,113	0,216	0,315	0,404
540	0,066	0,122	0,235	0,342	0,440
550	0,077	0,146	0,276	0,403	0,520
555	0,080	0,157	0,301	0,441	0,568
560	0,086	0,163	0,314	0,468	0,590
565	0,081	0,154	0,300	0,437	0,561
570	0,072	0,136	0,262	0,384	0,492
580	0,038	0,068	0,135	0,197	0,256
590	0,018	0,032	0,060	0,088	0,114
600	0,010	0,014	0,028	0,040	0,054
620	0,006	0,006	0,012	0,016	0,022
640	0,003	0,002	0,006	0,007	0,012
650	0,003	0,002	0,006	0,006	0,010

Tab. 10

Extinktionen in Abhängigkeit von der Wellenlänge bei Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardlösungen nach STEGEMANN, 1958. (s. 3.1.2. Abb. 7)

Erhitzungszeit [min]	5	10	15	20	25	30
Extinktionen	0,117	0,218	0,259	0,282	0,271	0,249
	0,115	0,216	0,257	0,275	0,269	0,244
	0,115	0,216	0,255	0,276	0,270	0,244
	$\bar{x}$	0,217	0,257	0,278	0,270	0,246

Tab. 11

Extinktionen bei Bestimmung von Hydroxyprolinstandardproben
(4 μg Hypro/Ansatz) mit unterschiedlichen Erhitzungszeiten
(s.3.1.3. Abb. 8)

Zeitpunkt der Messung nach Wasserbadentnahme [in Min.]		Erhitzungszeit	[in Min.]
	15	20	25
5	0,259	0,282	0,271
5	0,257 $\bar{x}$ 0,257	0,275 $\bar{x}$ 0,278	0,269 $\bar{x}$ 0,270
5	0,255	0,276	0,270
10	0,266	0,283	0,272
10	0,262 $\bar{x}$ 0,263	0,277 $\bar{x}$ 0,279	0,271 $\bar{x}$ 0,271
10	0,260	0,278	0,271
20	0,269	0,283	0,270
20	0,264 $\bar{x}$ 0,266	0,277 $\bar{x}$ 0,279	0,268 $\bar{x}$ 0,269
20	0,264	0,278	0,269
30	0,267	0,282	0,268
30	0,263 $\bar{x}$ 0,264	0,276 $\bar{x}$ 0,278	0,264 $\bar{x}$ 0,265
30	0,263	0,277	0,263
40	0,267	0,279	0,264
40	0,262 $\bar{x}$ 0,263	0,273 $\bar{x}$ 0,275	0,262 $\bar{x}$ 0,262
40	0,261	0,273	0,260
50	0,265	0,275	0,257
50	0,260 $\bar{x}$ 0,262	0,269 $\bar{x}$ 0,271	0,257 $\bar{x}$ 0,257
50	0,260	0,269	0,257
60	0,263	0,272	0,253
60	0,257 $\bar{x}$ 0,259	0,266 $\bar{x}$ 0,268	0,253 $\bar{x}$ 0,253
60	0,258	0,266	0,253

Tab. 12

Extinktionen bei Bestimmung von Hydroxyprolinstandardproben (4 μg Hypro/Ansatz) mit unterschiedlichen Erhitzungszeiten. Photometrische Messung während einer Stunde nach Wasserbadentnahme (s.3.1.3.).

Perchlorsäure-					
Konzentration	4,73	3,15	1,58	0,79	
[Mol/l]					
	0,265	0,312	0,236	-	
Extinktionen	0,263	0,309	0,233	-	
	0,262	0,307	0,230	-	
$\bar{x}$	0,263	0,309	0,233	-	

Tab. 13

Extinktionen bei Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardlösungen (4 µg Hypro/Ansatz) unter Anwendung unterschiedlich starker Perchlorsäurelösungen (s. 3.1.4. Abb. 9).

p-DAB						
[g/100 ml]	5	10	15	20	25	
	0,260	0,312	0,333	0,344	0,342	
Extinktionen	0,259	0,306	0,331	0,341	0,342	
	0,254	0,308	0,332	0,337	0,343	
$\bar{x}$	0,257	0,309	0,332	0,341	0,342	
Leerwert	0,018	0,022	0,025	0,028	0,031	

Tab. 14

Extinktionen bei Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardlösungen (4 µg Hypro/Ansatz gegen Leerwert) unter Anwendung unterschiedlich starker p-DAB-Lösungen. Leerwert gegen aqua dest. gemessen (s. 3.1.5. Abb. 10).

Zeitpunkt der Messung nach Wasserbad- entnahme [in Min.]		Extinktionen	
5	0,346		
	0,347	$\bar{x}$	0,346
	0,344		
10	0,348		
	0,349	$\bar{x}$	0,348
	0,346		
15	0,349		
	0,350	$\bar{x}$	0,349
	0,347		
20	0,350		
	0,351	$\bar{x}$	0,349
	0,347		
25	0,349		
	0,351	$\bar{x}$	0,349
	0,347		
35	0,351		
	0,351	$\bar{x}$	0,350
	0,347		
45	0,345		
	0,348	$\bar{x}$	0,346
	0,344		
60	0,346		
	0,348	$\bar{x}$	0,346
	0,343		

Tab. 15

Extinktionen bei Bestimmungen von Hydroxyprolinstandard-
lösungen [4 µg Hypro/Ansatz] unter Anwendung einer 20 %
p-DAD-Lösung. Photometrische Messung der Proben während
einer Stunde nach Wasserbadentnahme (s.3.1.5.)

Lösungsmittel	Extinktionen 4 µg Hypro/Ansatz		Leerwert gegen aqua dest.
dest. Methyl- cellosolve	0,417	$\bar{x}$ 0,417	0,022
	0,419		
	0,416		
n-Propanol	0,505	$\bar{x}$ 0,505	0,031
	0,506		
	0,505		
iso-Propanol	0,496	$\bar{x}$ 0,496	0,027
	0,497		
	0,495		

Tab. 16

Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardproben unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel. Photometrische Messung der Probe [4 µg Hypro/Ansatz] gegen Leerwert und Leerwert gegen aqua dest. (s.3.1.6.)

Zeitpunkt der Messung nach Wasserbadentnahme [in Min.]	Extinktionen bei Verwendung von		
	dest.Methylcellosol.	n-Propanol	iso-Propanol
10	0,416	0,505	0,496
20	0,417	0,505	0,497
30	0,416	0,505	0,498
40	0,414	0,505	0,498
50	0,409	0,502	0,496
60	0,402	0,500	0,496

Tab. 17

Extinktionen bei Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardlösungen [4 µg Hypro/Ansatz] unter Verwendung verschiedener Lösungsmittel. Photometrische Messung der Proben während einer Stunde nach Wasserbadentnahme. (s.3.1.6. Abb. 11)

Chloramin-T- Lösung [Mol/l]	Extinktionen		
0,1	0,454	$\bar{x}$	0,454
	0,454		
	0,453		
0,05	0,438	$\bar{x}$	0,496
	0,496		
	0,495		
0,025	0,499	$\bar{x}$	0,499
	0,499		
	0,498		
0,0125	0,502	$\bar{x}$	0,501
	0,501		
	0,501		

Tab. 18

Extinktionen bei Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardproben [4 µg Hypro/Ansatz] unter Anwendung verschieden starker Chloramin-T-Lösungen (s.3.1.7. Abb. 12)

Zeitpunkt der Messung nach Wasserbadentnahme [in Min]	Extinktionen bei unterschiedlichen Chl-T-Konzentrationen [Mol/l]			
	0,1	0,05	0,025	0,00125
10	0,450	0,496	0,497	0,500
20	0,455	0,496	0,499	0,502
30	0,455	0,496	0,501	0,505
40	0,455	0,496	0,505	0,508
50	0,453	0,494	0,508	0,510
60	0,450	0,490	0,510	0,512

Tab. 19

Extinktionen bei Bestimmungen von Hydroxyprolinstandardproben [4 µg Hypro/Ansatz] unter Verwendung verschieden starker Chloramin-T-Lösungen.

Photometrische Messung der Proben während einer Stunde nach Wasserbadentnahme (s. 3.1.7. Abb. 13)

Oxidationszeit [Min.]	5	10	15	20	25
	0,448	0,495	0,505	0,505	0,504
Extinktionen	0,448	0,495	0,505	0,505	0,505
	0,450	0,494	0,505	0,505	0,505
$\bar{x}$	0,449	0,495	0,505	0,505	0,505

Tab. 20

Extinktionen bei Bestimmung von Hydroxyprolinstandardproben
[4 µg Hypro/Ansatz] mit unterschiedlichen Oxidationszeiten
(s. 3.1.7. Abb. 14)

Zeitpunkt der Messung nach Wasserbadentnahme [in Min.]	Extinktionen				
	1 µg	2 µg	4 µg	6 µg	8 µg
5	0,127	0,246	0,496	0,719	0,945
10	0,138	0,248	0,496	0,719	0,946
15	0,138	0,247	0,494	0,719	0,943
20	0,138	0,247	0,494	0,719	0,943
30	0,138	0,247	0,494	0,719	0,943
40	0,139	0,246	0,494	0,716	0,943
50	0,130	0,233	0,492	0,710	0,941
60	0,127	0,230	0,476	0,700	0,921

Tab. 21

Extinktionen bei Bestimmung von Hydroxyprolinstandardproben
[1-8 µg Hypro/Ansatz] nach Arbeitsvorschrift in 3.2.1.
Photometrische Messung der Proben während einer Stunde nach
Wasserbadentnahme.

Extinktionen bei μg HP/2 ml Probe					
Analysen-Nr.	1 μg HP	2 μg HP	4 μg HP	6 μg HP	8 μg HP
1	0,116	0,234	0,457	0,682	0,890
2	0,116	0,232	0,456	0,685	0,890
3	0,114	0,232	0,456	0,680	0,880
4	0,116	0,228	0,454	0,680	0,885
5	0,123	0,232	0,456	0,684	0,885
6	0,113	0,232	0,461	0,680	0,880
7	0,116	0,229	0,457	0,681	0,880
8	0,116	0,235	0,454	0,681	0,890
9	0,109	0,224	0,448	0,678	0,880
10	0,118	0,238	0,464	0,695	0,890
11	0,117	0,233	0,462	0,682	0,876
12	0,117	0,235	0,462	0,687	0,880
13	0,114	0,230	0,456	0,685	0,885
14	0,113	0,233	0,457	0,685	0,882
15	0,114	0,233	0,462	0,692	0,885

Tab. 22

Extinktionen bei Bestimmung von Hydroxyprolinstandardproben unter konstanten Versuchsbedingungen nach Vorschrift 3.2.1. Einzelwerte zur Ermittlung von Mittelwerten, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten für Tab. 6 in 3.2.2.

Bestimmungsmethode	Extinktionen				
	1 µg	2 µg	4 µg	6 µg	8 µg
STEGEMANN, 1958	0,068	0,136	0,256	0,380	0,496
	0,069	0,137	0,257	0,386	0,496
	0,068	0,135	0,255	0,380	0,496
	$\bar{+}$ 0,068	0,136	0,256	0,382	0,496
PROCKOP and UDENFRIEND, 1960	0,025	0,049	0,082	0,117	0,162
	0,026	0,042	0,082	0,128	0,159
	0,026	0,045	0,080	0,120	0,161
	$\bar{+}$ 0,026	0,045	0,081	0,122	0,161
WOESSNER, 1961	0,082	0,172	0,338	0,496	0,649
	0,087	0,172	0,341	0,493	0,649
	0,085	0,171	0,340	0,492	0,648
	$\bar{+}$ 0,085	0,172	0,340	0,494	0,649
STEGEMANN and STALDER, 1967	0,105	0,207	0,400	0,598	0,785
	0,106	0,209	0,401	0,596	0,782
	0,105	0,207	0,400	0,596	0,786
	$\bar{+}$ 0,105	0,208	0,400	0,597	0,784
BERGMAN and LOXLAY, 1970	0,111	0,216	0,440	0,660	0,890
	0,117	0,224	0,440	0,655	0,878
	0,113	0,217	0,440	0,655	0,880
	$\bar{+}$ 0,114	0,219	0,440	0,657	0,883
CLEARY and SAUNDERS, 1974	0,150	0,286	0,579	0,847	1,12
	0,145	0,277	0,572	0,835	1,10
	0,145	0,282	0,580	0,850	1,13
	$\bar{+}$ 0,148	0,282	0,577	0,844	1,12
EIGENE METHODE, s. 3.2.1.	0,135	0,270	0,529	0,782	1,045
	0,133	0,260	0,516	0,782	1,045
	0,134	0,261	0,514	0,775	1,045
	$\bar{+}$ 0,134	0,265	0,520	0,780	1,045

Tab. 23

Extinktionen bei Bestimmung von Hydroxyprolinstandardproben
[1-8 µg Hypro/Ansatz] nach Vorschrift der entsprechenden Autoren.
(s. 3.3.3. Abb. 16)

STEGEMANN, 1958	Hydroxyprolinkonz. [$\mu\text{Mol/l}$] Extinktion $\bar{x}$ Molarer Extinktionskoeff.	1,53 0,068 44400	3,06 0,136 44400	6,12 0,256 41800	9,18 0,382 41600	12,24 0,496 40500
PROCKOP and UDENFRIEND, 1960	Hydroxyprolinkonz. [$\mu\text{Mol/l}$] Extinktion $\bar{x}$ Molarer Extinktionskoeff.	1,09 0,026 23800	2,18 0,045 20600	4,36 0,081 18500	6,54 0,122 18600	8,72 0,161 18500
WOESSNER, 1961	Hydroxyprolinkonz. [$\mu\text{Mol/l}$] Extinktion $\bar{x}$ Molarer Extinktionskoeff.	1,53 0,085 55600	3,06 0,172 56200	6,12 0,340 55500	9,18 0,494 53800	12,24 0,649 53000
STEGEMANN und STALDER, 1967	Hydroxyprolinkonz. [$\mu\text{Mol/l}$] Extinktion $\bar{x}$ Molarer Extinktionskoeff.	1,91 0,105 55000	3,82 0,208 54500	7,64 0,400 52400	11,46 0,597 52100	15,28 0,784 51300
BERGMAN und IOXLAY, 1970 (A)	Hydroxyprolinkonz. [$\mu\text{Mol/l}$] Extinktion $\bar{x}$ Molarer Extinktionskoeff.	1,27 0,114 89800	2,54 0,219 86200	5,08 0,440 86600	7,62 0,657 86200	10,16 0,883 86900
CLEARY und SAUNDERS, 1974	Hydroxyprolinkonz. [$\mu\text{Mol/l}$] Extinktion $\bar{x}$ Molarer Extinktionskoeff.	2,54 0,148 58300	5,08 0,282 59500	10,16 0,577 56800	15,24 0,844 55400	20,32 1,12 55100
EIGENE METHODE	Hydroxyprolinkonz. [$\mu\text{Mol/l}$] Extinktion $\bar{x}$ Molarer Extinktionskoeff.	1,91 0,134 70200	3,82 0,265 69400	7,64 0,520 68100	11,46 0,780 68100	15,28 1,045 68400

Tab. 24

Bestimmung von Hydroxyprolinstandardproben nach Vorschrift der entsprechenden Autoren. Meßwerte wie in Tab. 23 Versuch 3.3.3. Extinktionen bezogen auf Hydroxyprolinkonzentrationen in $\mu\text{Mol/l}$.

$$\left[\frac{1}{\mu\text{mol} \cdot \text{cm}} \right] \quad (\text{s. auch Tab. 8 : mittlerer mikro-molarer Extinktionskoeffizient.})$$

Zeitpunkt der Messung nach Wasserbadentnahme [Min.]	BERGMAN und LOXLAY 1970	CLEARY und SAUNDERS 1974	EIGENE METHODE
10	0,440	0,568	0,529
20	0,440	0,650	0,528
30	0,440	0,590	0,529
40	0,440	0,610	0,528
50	0,439	0,612	0,522
60	0,439	0,592	0,522

Tab. 25

Stabilitätsprüfung: Messung einer Extinktion einer Hydroxyprolinstandardprobe [4 µg Hypro/Ansatz] nach drei verschiedenen Arbeitsvorschriften während einer Stunde nach Wasserbadentnahme.

7. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- ADAMS, E. and
A. GOLDSTONE : Hydroxyproline metabolism, II.
 J. Biol. Chem. 235, 3492 - 3498
 (1960 a)
- ADAMS, E. and
A. GOLDSTONE : Hydroxyproline metabolism, IV.
 J. Biol. Chem. 235, 3504 - 3512
 (1960 b)
- ADAMS, E. : Metabolism of proline and of
 hydroxyproline.
 Internat. Rev. Connect. Tissue
 Res. 5, 1 - 91 (1970)
- ALEXEENKO, L.P. and
V.N. OREKHOVICH : A method for proline and hydroxy-
 proline determination by means of
 ninhydrin reaction in acid medium
 after starch chromatography.
 Dokl. Akad. Nauk sssR 133, 690 - 693
 (1960)
- AMMA, M.K.P. and
TANDON, H.K.L. : A micro method for hydroxyproline-esti-
 mation.
 Indian J. Med. Res. 57, 1115 - 1121
 (1969)

- ARNOLD, E.,
E.HVIDBERG, and
S.RASMUSSEN
- : Methodological studies of the
distribution of hydroxyproline
in human serum.
Scand. J. Clin.Lab.Invest.24,
231 - 235 (1969)
- BAKER, L.C.,
L.H.LAMPITT, and
K.P.BROWN
- : Connective tissue of meat.II.
Determination of Hydroxyproline
J.sci.Fd.Agric.4, 165 - 172
(1953)
- BANNISTER,B.W. and
A.B. BURNS
- : Adaptation of the Bergman and
Loxlay technique for hydroxyproline
determination to the autoanalyzer and
its use in dertermining plasma hydroxy-
proline in the domestic fowl.
Analyst 95, 596 - 600 (1970)
- BEKHOR, I.J. and
L.A. BAVETTA
- : Studies on determination of hydroxy-
proline.
Anal. Chem. 33, 1807 (1961)
- BENOIT, F.L.,
G.B. THEIL and
R.H. WATTEN
- : Evidence for renal tubulär secretion
of hydroxyproline peptides.
Clin. Res. 12, 247 - 255 (1964)

- BENOIT, F.L. and
R.H. WATTEN : Renal tubular transport of hydroxy-
proline peptides: evidence for
reabsorption and secretion.
Metabolism 17, 20 - 33 (1968)
- BERGMAN, M. and
R. LOXLAY : Two improved and simplified me-
thods for the spectrophotometric
determination of hydroxyproline.
Analytical chemistry 35, 1961 - 1965
(1963)
- BERGMAN, I. and
R. LOXLAY : Lung tissue hydrolysates: studies
of the optimum conditions for the
spectrophotometric determination
of hydroxyproline.
Analyst 94, 575 - 584 (1969)
- BERGMAN, I. and R.
LOXLAY : The determination of hydroxyproline
in urine hydrolysates.
Clin. Chim. Acta 27, 347 - 349 (1970)
- BLAU, K. and
A. DABRE : Gaschromatography of volatile
amino acids derivatives.
II. Leucine, cysteine, proline, hy-
droxyproline, methionine, phenyl-
alanine, aspartic acid and gluta-
mic acid.
J. Chromatog. 17, 445 - 449 (1965)

- BLOMERFIELD, J. and
J.F.FARRAR : Factors affecting the determination of hydroxyproline.
Anal. Chem. 36, 950 - 952 (1964)
- BLUMENKRANZ, N. and
G. ASBOE-HANSON : A quick and specific assay for hydroxyproline.
Anal. Biochem. 55, 288 - 291 (1973)
- BOLLET, A.J. : Urinary excretion of hydroxyproline. In Cohen, A. (ed.): Diagnostic procedures in rheumatic diseases.
Boston, Mass.: 1967
- BONDJERS, G. and
S.BJÖRKERUD : Spectrophometric determination of hydroxyproline in connective tissue on the nanogram level.
Anal. Biochem. 52, 496 - 504 (1973)
- BOREL, J.P.,
J.M.CARANJOT and
M.F. JAYLE : Un mode de fractionnement des peptides urinaires contenant de l'hydroxyproline.
Clin. Chim. Acta 16, 409 - 416 (1967)
- BOWES, J.H. : Hydroxyproline as a measure of hide substance.
J. Soc. Leath.Trades Chem. 43,
203 - 211 (1959)

- BUDECKE, E. : Grundriß der Biochemie
Berlin (1971)
- BURKHARDT, H.,
F. BURKHARDT and
K. ROMMEL : Die Messung des Kollagenstoff-
wechsels mit dem Hypronosticon-Test.
Dtsch. Med. Wochenschr. 98,
1847 - 1848 (1973)
- CALLAHAN, P. X.,
J. A. SHEPARD and
S. ELLIS : Accelerated chromatographic method
for determination of hydroxyproline.
Anal. Biochem. 49, 155 - 163 (1972)
- CHENG, P. T. : An improved method for the deter-
mination of hydroxyprolin in rat
skin.
J. Invest. Derm. 53, 112 - 115 (1969)
- CHVAPIL, M. and
B. CUMCHALOVA : Dynamics of changes in connective
tissue components during develop-
ment of carrageenan granuloma.
Exper. Med. 19, 171 - 182 (1961)
- CHVAPIL, M. and
D. S. JACKSON : Evidence of the degradative origin
of free hydroxyproline and peptides
containing hydroxyproline.
Collagen currents 5, 161 (1964)

- CHVAPIL, M. and
J. HURYCH : Control of collagen biosynthesis.
Internat.Rev.Connect.Tissue Res.4,
67 - 1996 (1968)
- CLEARY, J. and
R.A. SAUNDERS : A simplified procedure for the
measurement of total hydroxypro-
line in urine.
Clin.Chim.Acta 57, 217 - 223 (1974)
- CUCCO, A. : Determination of hydroxyproline in
collagen and leather.
Cuoio, Pelli, Mat. Concianti 38,
214 (1962)
J.Soc.Leaner Trades Chemists 47,
238 - 239 (1963) (abstr.)
- DAHL, O. and
K.-A. PERSSON : Hydroxyproline, methodological
studies of analysis.
Acta chem.Scand.17, 2499 - 2503
(1963)
- DREUX, C. and
J. LEYMARIE : Dosage automatique de l'hydroxy-
proline urinaire.
Ann.Biol.Clin. 26, 641 - 650 (1968)
- DUPONT, A. : On the determination of hydroxy-
proline in urine
Clin.Chim.Acta 18, 59 - 63 (1967)

- FELLS, I.G. : Determination of hydroxyprolin
in liver.
Clin.Chem. 4, 62 - 65 (1958)
- FILLIAT M., J.COTTE:
and M.BRUNET : Method of determination of urinary
hydroxyproline
Path.Biol. 14, 767 - 770 (1966)
- FIRSCHEIN, H.E. and
J.P. SHILL : The determination of total hydroxy-
proline in urine and bone extracts.
Anal.Biochem. 14, 296 - 304 (1966)
- FREY, J. : Etude d'une methode d'exploration
et du taux normal de l'hydroxyproline
du serum.
Biochim.Biophys.Acta 111, 440 - 449
(1965)
- GIBBS, B.F.,
K. ITIABA and
J.C.CRAWHALL : Gaschromatographic estimation of
hydroxyproline.
Clin. Chim.Acta 54, 395 - 398 (1974)
- GOLDSTONE, A. and
E. ADAMS : Metabolism of γ -hydroxyglutamic acid.
J.Biol.Chem. 237, 3476 - 3486 (1962)
- GOLL, D.E.,
R.W.BRAY and
W.G. HOEKSTRA : Age-associated changes in muscle
composition. The isolation and pro-
perties of a collagenous residue
from bovine muscle.
J.Food Sci. 28, 503 - 509 (1963)

- GOVERDE, B.C. and
F.J.N. VEENKAMP : Routine assay of total urinary
hydroxyproline based on resin-cata-
lysed hydrolysis.
Clin. Chim. Acta 41, 29 - 40 (1972)
- GRANT, R.A. : Estimation of hydroxyproline by the
Auto Analyzer.
Med. J. Clin.Path. 17, 685 - 686
(1964)
- GRASSMANN, W.,
J.ENGEL, K. HANNIG,
K.KÜHN und
A. NORDWIG : Kollagen
Fortschr.Chemie org. Naturst. 23,
195 - 314 (1965)
- GRAY, D.O., J.BLAKE,
D.H.BROWN and
L.FOWDEN : Chromatographic seperation of
amino acid isomers.
J. Chromatog. 13, 276 - 277 (1964)
- GREEN, N.M. and
D.A.LOWTHER : Formation of collagen hydroxy-
proline in vitro.
Biochem.J. (London) 71, 55 - 66
(1959)
- GROSS, J. : Studies in the formation of colla-
gen. IV. Effect of vitamin C deficiency
on the neutral salt extractable colla-
gen of skin.
J. Exper.Med. 109, 557 - 569 (1959)

- GRUNBAUM, W. and
D. GLICK : Studies in histochemistry XLV.
Determination of hydroxyproline
in microgram amounts of tissue.
Arch. Biochem. Biophys. 65, 260 - 267.
(1956)
- HANNIG, K. and
A. NORDWIG : Amino acid sequences in Collagen.
In G.N. Ramachandran (ed.): Treatise
on Collagen, Vol. 1, p. 73
London - New York, 1967
- HANSON, H. and
B. WIEDERANDERS : Fractionation of hydroxyproline-con-
taining urinary peptides by Sephadex gel
filtration.
Clin. Chim. Acta 25, 255 - 662 (1969)
- HEIDRICH; G.L. and
L. WYNSTON : A report on the presence of a third
alpha component in calf and rat skin
tropokollagen.
Hoppe-Seyler's Zschr. physiol. Chem.
342, 166 - 169 (1965)
- HOLZMANN, H.
B. MORSCHES,
R. GEBHARDT und
F. LIEDTKE : Zum "Collagen-like protein"-Gehalt
im Serum von Psoriatikern.
Klin. Wschr. 48, 1197 - 1198 (1970)

- HOWELLS,G.R. and
R.G.WHITEHEAD : A system for the estimation of
the urinary hydroxyproline in-
dex.
J. med. Lab.Tech.24,98 - 102 (1967)
- HURYCH,J. and
M. CHVAPIL : Present problems of collagen re-
search. V.Methods of hydroxy-
proline determination (in Czech).
Kozarstvi 12, 317 - 323 (1962).
- HURCHY,J. and
M. CHVAPIL : Influence of chelating agents
on the biosynthesis of collagen.
Biochim.Biophys. Acta 97, 361 -
363 (1965)
- HUTTERER,F. and
E.J.SINGER : A modified method for hydroxy-
proline determination.
Analyt.Chem.32, 556 - 558
(1960)
- JACKSON,D.S. and
J.P. BENTLEY : On the significance of the
extractable collagens.
J.Biophys.Biochem.Cytol.7,
37 - 43 (1960)
- JACKSON,D.S. and
E.G.CLEARY : The determination of collagen
and elastin.
Meth.Biochem.Anal.15,25-76 (1967)

- JASIN, H.E.,
C.W.FINK,
W.WISE and
M.ZIFF : Relationship between urinary
hydroxyproline and growth.
J.Clin.Invest.41, 1928 - 1935
(1962)
- JONES, J.D.,
A.C.SKALET and
P.C.BURNETT : Automated determination of to-
tal hydroxyproline in urine:
use of internal standard.
Anal.Biochem.37, 194 - 197 (1970)
- JUVA, K., D.J.PROCKOP,
G.W.COOPER and
J.W.LASH : Hydroxylation of proline and the
intracellular accumulation of a
polypeptide precursor of colla-
gen.
Science 152, 92 (1966)
- JUVA, K. and
D.J.PROCKOP : Modified procedure for the assay
of H³-or C¹⁴-labeled hydroxypro-
line.
Anal.Biochem. 15, 77 - 83 (1966)
- KEISER, H.R.,
E.L.Le ROY,
S.UDENFRIEND and
A.SJOERDSMA : Collagen-like protein in human
plasma.
Science 142, 1678 - 1679 (1963)

- KIBRICK, A.C.,
C.A. HASHIRO and
L.B. SAFIER : Hydroxyproline peptides of urine in arthritic patients and controls on a collagen-free diet. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. (N.Y.) 109, 473 - 478 (1962)
- KIBRICK, A.C.,
C.Q. HASHIRO,
M. WALTERS and
A.T. MILHORAT : Hydroxyprolin in human blood; forms in which is present. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. (N.Y.) 119, 622 - 625 (1965)
- KIBRICK, A.C.,
H. BIENENSTOCK and
K.D. Singh : Serum protein and non-protein hydroxyprolin in patients with rheumatoid arthritis: Description of modified method for protein hydroxyproline. Clin. Chim. Acta 46, 173 - 180 (1973)
- KIVIRIKKO, K.I. : Hydroxyproline-containing fractions in normal and cortisone-treated chick embryos. Acta physiol. Scand. 60, Suppl. 219 (1963)
- KIVIRIKKO, K.I.,
O. LAITINEN, J. AER and
J. HALME : Studies with 14-C proline on the action of cortisone on the metabolism of collagen in the rat. Biochem. Pharmacol. 14, 1445 - 1451 (1965)

- KIVIRIKKO, K.I. and
D.J. PROCKOP : Enzymatic hydroxylation of pro-
line and lysine in protokollagen.
Proc.Nat.Acad.Sci. 67, 782 - 789
(1967 a)
- KIVIRIKKO, K.I. and
D.J. PROCKOP : Purification and partial characteri-
zation of the enzyme for the hy-
droxylation of proline in proto-
collagen.
Arch.Biochem.Biophys. 118,
611 - 618 (1967 b)
- KIVIRIKKO, K.I. and
D.J. PROCKOP : Hydroxylation of proline in syn-
thetic polypeptides with puri-
fied protocollagen hydroxylase.
J.Biol.Chem. 242, 4007 - 4012 (1967c)
- KIVIRIKKO, K.I.,
O.LAITINEN and
D.J. PROCKOP : Modifications of a specific assay
for hydroxyproline in urine.
Anal.Biochem. 19, 249 - 255 (1967)
- KIVIRIKKO, K.I. : Urinary excretion of hydroxypro-
line in health and disease.
Int.Rev.Connect.Tissue Res. 5,
93 - 163 (1970)
- KO, C.T. : An improved method for the photo-
metric determination of hydroxy-
proline.
Sheng Wu Hua Hsueh Yu Sheng Wu Wu
Li Hsuch Pao 4, 476 - 480 (1964)

- KOBRLE, V. and
M. CHVAPIL : Isolation of peptides containing
hydroxyproline from animal tissues.
Nature (London) 190, 909 - 910
(1961 a)
- KOBRLE, V. and
M. CHVAPIL : Changes of ultra filtrable hydroxy-
proline in blood-serum during de-
velopment of carageenan granuloma
and during aging of rats and guinea
pigs.
Experientia (Basel) 17, 519 - 520
(1961 b)
- KOEVOET, A.L. : The determination of hydroxypro-
line in urine.
Clin. Chim. Acta 13, 232 - 234 (1965)
- KOEVOET, A.L. and
J.D. BAARS : The determination of urinary
hydroxyproline.
Clin. Chim. Acta 25, 39 - 43 (1969)
- KORTING, G.W. und
H. HOLZMANN : Die Sklerodermie und ihr nahe-
stehende Bindegewebsprobleme.
Stuttgart, 1967
- KRIEDEL, W.,
U. LANGNESS und
P. JAHN : Das "Collagen-like protein" (CLP)
und Kollagenantikörper im Serum
bei chronischer Polyarthritits und
nicht rheumatischen Bindegewebs-
krankungen.
Klin. Wschr. 6, 368 - 370 (1970)

- KÜHN, K. : The structure of collagen.
Essays in Biochemistry 5, 59 - 87
(1969)
- LAITINEN, O.
E.A. NIKKILÄ and
K.I. KIVIRIKKO : Hydroxyproline in the serum and
urine. Normal values and clinical
significance.
Acta Med. Scand. 179, 275 - 284
(1966)
- LAITINEN, O. : The metabolism of collagen and
its hormonal control in the rat.
Acta endocr. Suppl. 120, 86 (1967)
- LAITINEN, O. : Clinical applications of urinary
hydroxyproline determination.
Acta Med. Scand. Suppl. 577, 1 - 57,
(1975)
- LAMPORT, D. T. : The isolation and partial characteri-
zation of hydroxyproline-rich gly-
copeptides obtained by enzymic
degradation of primary cell walls.
Biochemistry (Wash.) 8, 1155 - 1163
(1969)
- LANG, K. : Eine Mikromethode zur Bestimmung
des Prolins und des Oxyprolins.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 219,
148 - 154 (1933)

- LANGNESS, U. : Hydroxyprolinausscheidung und Kollagenstoffwechsel
Deutsche Med. Wschr. 95, 2530 - 2535,
(1970)
- LEACH, A. A. : Notes on a modification of the Neuman and Logan method for the determination of the hydroxyproline.
Biochem. J. 74, 70 - 71 (1960)
- LEACH, A. A. : The determination of gelatin in blood and urine.
Anal. Biochem. 2, 529 - 531 (1961)
- Le ROY, E. C.,
A. KAPLAN,
S. UDENFRIEND and
A. SJOERDSMA : A hydroxyproline-containing, collagen-like protein in plasma and procedure for its assay.
J. Biol. Chem. 239, 3350 - 3356
(1964)
- Le ROY, E. C. and
A. SJOERDSMA : Clinical significance of a hydroxyproline-containing protein in human plasma.
J. Clin. Invest. 44, 914 - 919 (1965)
- Le ROY, E. C.,
E. D. HARRIS and
A. SJOERDSMA : A modified procedure for radioactive hydroxyproline in urine and tissues after labeled proline administration.
Anal. Biochem. 17, 377 - 382 (1966)

- Le ROY, E.C. : The technique and significance of hydroxyproline measurement in man. *Advances Clin.Chem.* 10, 213 - 253, (1967)
- LEVINE, R.S. : A nanogram method for hydroxyproline. *Microchim.Acta* 5, 797 - 800 (1973)
- LOLLAR, R.M. : Hydroxyproline analysis as a tool for tannery chemists. *J.Amer.Leath.Chem.Ass.* 53, 2 - 23 (1958)
- LUKENS, L.N. : Evidence for the nature of the precursor that is hydroxylated during the biosynthesis of collagen hydroxyproline. *J.Biol.Chem.* 240, 1661 - 1669, (1965)
- MARTIN, CH.J. and A.E. AXELROD : A modified method for determination of hydroxyproline. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 83, 461 - 462 (1953)
- MARCUCCI, F. and E. MUSSINI : Separation of proline and hydroxyproline derivatives by thin - layer chromatography. *J.Chromatog.* 18, 431 - 432 (1965)

- MASKALERIS, M.L.,
E.S. SEVENDAL and
A.C. KIBRICK : Carbobenzoxy derivatives of amino
acids and peptides: Instant thin-
layer chromatography as hydrobrom-
ides.
J. Chromatog. 23, 403 - 409 (1966)
- Mc FARLANE, W.D. and
G.H. GUEST : A new colorimetric method for the
determination of hydroxyproline
and its application to gelatin
hydrolyzates.
Can. J. Res. B 17, 139 - 142 (1939)
- MEE, J.M.L. : Specific assay of hydroxyproline
by gas chromatography.
J. Chromatog. 87, 155 - 161 (1973)
- MEILMANN, E.,
M.M. URIVETZKY and
C.M. RAPPORT : Urinary hydroxyproline peptides.
J. Clin. Invest. 42, 40 - 50 (1963)
- MITOMA, C.
T.E. SMITH,
J.D. DAVIDSON,
S. UDENFRIEND,
F.M. Da COSTA and
A. SJOERDSMA : Improvements in methods for measu-
ring hydroxyproline: application
to human urine.
J. Laborat. Clin. Med. 53, 970 - 976,
(1959)

- MITCHELL, A.D. and
J.E.P. TAYLOR : The spectrophotometric determination of hydroxyproline. An analytical investigation.
Analyst 95, 1003 - 1011 (1970)
- MIYADA, D.S. and
A.L. TAPPEL : Colorimetric determination of hydroxyproline.
Analyt. Chem. 28, 909 - 910 (1956)
- MORSCHES, B.,
H. HOLZMANN und
A. SCHLAUDECKER : Untersuchungen zum Verhalten des "Collagen-like-Protein" im Serum von Ratten in Abhängigkeit vom Alter und von der Anwendung verschiedener Bindegewebs-wirksamer Substanzen.
Ärztliche Forschung 21, 421 - 430 (1967)
- MORSCHES, B. : Tierexperimentelle Untersuchungen über die Beziehungen zwischen der Hydroxyprolinausscheidung im Urin und den Hydroxyprolinfraktionen im Serum.
Habil.-Schrift, Mainz 1973
- MÜHLBACH, von R.,
D. HIRTKE and
K. LINDENHAYN : The elimination of bound hydroxyproline as an expression of alterations of the organic matrix of cartilage and bone.
Z. Arzneimittel Fortbild. 60, 597 - 602 (1966)

- MUSSINI, E. and
F. MARCUCCI : Separation of prolines and hydroxy-
prolines by gaschromatography.
J.Chromatog. 20, 266 - 269 (1965)
- MYHILL, D. and
D.S. JACKSON : Separation of proline and hydroxy-
proline using thin-layer chroma-
tography.
Anal.Biochem. 6, 193 - 198 (1963)
- NAGAI, Y.,
C.M. LAPIERE and
J. GROSS : Tadpole collagenase. Preparation
and purification.
Biochemistry 5, 3123 - 3130 (1966)
- NEUMAN, R.E. and
M.A. LOGAN : The determination of hydroxyproline
J.Biol.Chem. 184, 299 - 306 (1950)
- NICHOLLS, C.H.,
S. MAKISUMI and
H.A. SAROFF : Gas chromatography of the methyl
esters of the amino acids as the
free base and by dissociation of
their acid salts.
J.Chromatog. 11, 327 - 330 (1963)
- ONITSUKA, T. : A method for the determination
of hydroxyproline in tissues.
Seikagaku 32, 857 - 863 (1960)
- ORLOFF, S.,
V.H. RAO and
L. VERBRUGGEN : Automated analysis of total urinary
hydroxyproline based on resin-cata-
lysed hydrolysis.
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 12, 549 - 552
(1975)

- PAREKH, A.C. and
D.H. JUNG : An improved method for deter-
mination of total hydroxyproline in urine.
Biochem. Med. 4, 446 - 456 (1970)
- PARTRIDGE, S.M and
D.F. ELSDEN : Rapid methods for the determi-
nation of glucosamine, galactos-
amine and hydroxyproline.
Biochem. J. 80, 34 P (1961)
- PENNOCK, C.A.
G.R. MOORE and
M.D. HOYLE : Estimation of hydroxyproline in
urine.
J. med. Lab. Technol. 27, 302 - 307
(1970)
- PETERKOFKY, B. and
D.J. PROCKOP : A method for the simultaneous
measurement of the radioactivity and
proline-C¹⁴ and hydroxyprolin-C¹⁴
in biological materials.
Anal. Biochem. 4, 400 - 406 (1962)
- PIEZ, K.A. : Nonidentity of the three α -chains
in codfish collagen.
J. Biol. Chem. 239, 4215 (1964)
- PIEZ, K.A.,
F. IRREVERRE and
H.L. WOLFF : The separation and determination
of cyclic imino acids.
J. Biol. Chem. 223, 687 - 697 (1956)

- PIL'v, I.I. and
A.A.TITAEV : Procedure for the determination
of hydroxyproline and proline
in biological liquids.
Lab. Delo. 9, 22 - 25 (1963)
- PROCKOP, D.J. and
S. UDENFRIEND : Aspecific method for the analysis
of hydroxyproline in tissues and
urine.
Anal. Biochem. 1, 228 - 239 (1960)
- PROCKOP, D.J. and
A. SJOERDSMA : Significance of urinary hydroxy-
proline in man.
J. Clin. Invest. 40, 843 - 849 (1961)
- PROCKOP, D.J.,
S. UDENFRIEND and
S. LINDSTEDT : A simple technique for measuring
the specific activity of labeled
hydroxyproline in biological ma-
terials.
J. Biol. Chem. 236, 1395-1398 (1961)
- PROCKOP, D.J.,
H.R. KEISER and
A.SJOERDSMA : Gastrointestinal absorption and
renal excretion of hydroxypro-
line peptides.
Lancet 2, 527 - 528 (1962)
- PROCKOP, D.J. : Isotopic studies on collagen de-
gradation and the urine excre-
tion of hydroxyproline.
J. Clin. Invest. 43, 453 - 460
(1964)

- PROCKOP,D.J. and
K.JUVA : Synthesis of hydroxyproline in
vitro by the hydroxylation of
proline in a precursor of colla-
gen.
Proc.Nat.Acad.Sci.53, 661 - 668
(1965)
- PROCKOP,D.J. and
K.I.KIVIRIKKO : Relation of hydroxyproline ex-
cretion in urine to collagen
metabolism.Biochemistry and
clinical application.
Ann.Int.Med.66, 1243 - 1266
(1967)
- PROCKOP,D.J. and
K.I.KIVIRIKKO : Hydroxyproline and the metabolism
of collagen. In:Gould,B.S.(ed.):
Treatise on Collagen.
Vol.2, Part A.p. 215 - 247,
New York, 1968
- RADHAKRISHNAN,A.N.
and A.MEISTER : Conversion of hydroxyproline to
pyrrole-2-carboxylic acid.
J.Biol.Chem.226, 559 - 571 (1957)
- REICH, G. : Kollagen
Dresden, 1966
- ROGERS,C.J.,
J.R.KIMMEL,
M.E.HUTCHIN and
H.A.HARPER : A hydroxyproline method of analysis
for a modified gelatin in plasma and
urine.
J.Biol.Chem.206,553 - 559 (1954)

- ROJKIND, M. and
E. GONZALEZ : An improved method for determining specific radioactivities of proline- C^{14} and hydroxyproline- C^{14} in collagen and noncollagenous proteins.
Anal. Biochem. 57, 1 - 7 (1974)
- ROSANO, C. L. : Enzymic method for determination of hydroxyproline.
Anal. Biochem. 15, 341 - 345 (1966)
- SATWEKAR, K. and
A. N. RADHAKRISHNAN : Urinary excretion of hydroxyproline in tropical sprue.
Clin. Chim. Acta 10, 284 - 285 (1964)
- SCHULTZ-HANDT, S. D.,
J. AARLI, A. LOHRMANN
NIELSON and
O. UNHJEM : Hydroxyproline containing glycopeptides of some human and animal tissues.
Biochim. Biophys. Acta 101, 292 - 299 (1965)
- SCRIVER, C. R. and
H. GOLDMAN : Renal tubular transport of proline, hydroxyproline and glycine.
II. Hydroxyproline as substrate and as inhibitor in vivo.
J. Clin. Invest. 45, 1357 - 1363 (1966)

- SERAFINI-CESSI, F.
and CESSI, C. : An improved method for determination of hydroxyproline in protein hydrolyzates.
Anal.Biochem. 8, 527 - 528 (1964)
- SEYMOUR, G.C. and
M.J.JACKSON : Specific automated method for measurement of urinary hydroxyproline.
Clin.Chem. 20, 544 - 546 (1974)
- SJOERDSMA, A.,
S. UDENFRIEND,
H.KEISER and
E.C.Le ROY : Hydroxyproline and collagen metabolism.
Ann.Int.Med. 63, 672 - 694 (1965)
- STALDER, K. : Bestimmung von Hydroxyproline im Harn.
Z.Anal.Chem. 212, 196 - 199 (1965)
- STANLEY, E.M.,
K.B.DAWSON,
E.O.FIELD and
A.S.GLICKSMAN : An isotope dilution method for determining the absolute amounts and specific activities of proline and hydroxyproline in tissues.
Int.J.Appl.Radiation Isotopes 17,
467 - 477 (1966)

- STEGEMANN, H. : Mikrobestimmung von Hydroxy-
prolin mit Chloramin T und
p-dimethylaminobenzaldehyd.
Z.Physiol.Chem.311, 41 - 45 (1958)
- STEGEMANN, H. and
K.H. STALDER : Determination of hydroxyproline.
Clin.Chim.Acta 18, 267 - 273 (1967)
- SWITZER, B.R. and
G.K. SUMMER : Improved method for hydroxyproline analysis
in tissue hydrolysates.
Anal.Biochem.39, 487 - 491 (1971)
- TITAEV, A.A. : Determination of collagen-like
proteins in blood serum.
Lab.Delo.9, 5 - 7 (1963)
- TOMASZEWSKI, J. : Purification of hydroxyproline-
containing protein from human
serum.
Acta Biochim.Pol.18, 277 - 282
(1971)
- TROLL, W. and
R.K. CANNAN : A modified photometric ninhydrin
method for the analysis of amino
and imino acids.
J.Biol.Chem.200, 803 - 811 (1953)
- WALDSCHMIDT-LEITZ, E.
and S. AKABORI : Bestimmung von oxyprolin. Zur
Methode nach K.Lang.
Z.Physiol.Chem.224, 187 - 192
(1934)

- WALSER, A. and
G.A.SCHOENENBERGER: Practical evaluation of a new
method for the routine determi-
nation of urinary hydroxyproline (NHP)
Arzneim.Forsch.24, 841 - 843
(1974)
- WIERBICKI, E. and
F.E.DEATHERAGE : Hydroxyproline as an index of
connective tissue in muscle
J.Agric.Fd Chem.2, 878 - 882
(1954)
- WISS, von O. : Über eine Mikrobestimmung des
Oxyprolins in Blut und Harn;
Beeinflussung des Oxyprolinge-
haltes durch Verabreichung von
Prolin.
Helv.Chim.Acta 32, 149 - 153
(1949)
- WOESSNER, J.F. : The determination of hydroxyproline in tissue
and protein samples containing
small proportions of this imino-
acid.
Arch.Biochem.Biophys.93, 440 - 447
(1961)
- WOESSNER, J.F., Jr. : Biological mechanism of collagen
resorption. In: Gould, B.S. (ed.):
Treatise on collagen.
Vol.2, Part B.
New York 1968

- PAIDES, A.L.,
A.N. MIKHAILOV and
O.J. PUSHENKO : A modified method for hydroxy-
proline assay.
Biokhimiya 29, 5 - 7 (1964)
- JENDER, R. : Analyse de l'hydroxyproline uri-
naire. Methode et valeurs frequentes.
Clin.Chim.Acta. 37, 263 - 269
(1972)
- LIFF, M.,
A. KISBRICK,
E. CRESNER and
H.J. GRIBSTE : Excretion of hydroxyproline in
patients with rheumatic and non-
rheumatic diseases.
J.Clin.Invest. 35, 579 - 587
(1956)

Lebenslauf

Ich wurde am 17.8.1950 als erstes von drei Kindern des Postbeamten Friedrich Watermann und seiner Ehefrau Ingrid geb. Engelking in Meißen Krs. Minden geboren.

1957 trat ich in die dortige Volksschule ein und besuchte anschließend von 1961 an das mathematisch-naturwissenschaftliche Besselgymnasium, um dort 1969 das Abitur abzulegen. Das Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1970 an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz und bestand nach ausschließlichem Studium in Mainz die ärztliche Prüfung am 17.12.1976.

Meine im Sommer 1975 begonnene Dissertation habe ich während meiner anschließenden Medizinalassistentenzeit an der Hautklinik der Johannes Gutenberg-Universität und am Krankenhaus Seefeld/Obb. weitergeführt und im Oktober 1977 abgeschlossen. Seit dem 1.10.1977 bin ich als Medizinalassistent an der Medizinischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Fürstentfeldbruck tätig.

Herrn Professor Dr. B. Morsches spreche ich für die Überlassung des Themas sowie für zahlreiche Hinweise und Anregungen meinen Dank aus.

Ebenso danke ich Herrn Dr. P. Benes für die Beratung während meiner Arbeit.



